



HEMATOLOJİK MALİGNİTELERDE GENETİK ALGORİTMA KILAVUZU

ULUSAL TANI VE TEDAVİ KILAVUZU 2024

HEMATOLOJİK MALİGNİTELERDE GENETİK ALGORİTMA KILAVUZU

Sürüm 1.1 - Temmuz 2024



Hematolojik Malignitelerde Genetik Algoritma Kılavuzu
Türk Hematoloji Derneği ve **Tıbbi Genetik Derneği**'nin
katkılarıyla Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
tarafından hazırlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

Önsöz.....	VIII-X
Türk Hematoloji Derneği Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Bilimsel Alt Komitesi.....	XI
Kısaltmalar.....	XII-XIV

I. BÖLÜM

1. KRONİK MYELOİD LÖSEMİ	3
1.1. Tanı	3
1.2. Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri.....	4
1.2.1. Prognostik Genetik Faktörler.....	4
1.2.1.1. Kromozomal Anomaliler	4
1.2.1.2. Moleküler Anomaliler.....	4
1.2.2. Analiz Yöntemleri	5

II. BÖLÜM

2. MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLER	15
2.1. Tanı ve Sınıflandırma	15
2.2. Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri.....	18
2.2.1. Prognostik Genetik Faktörler.....	18
2.2.2. Analiz Yöntemleri	20
2.3. MPN'de Tedavi	22

III. BÖLÜM

3. MYELODİSPLASTİK NEOPLAZİLER	29
3.1. Tanı ve Sınıflandırma	29
3.2. Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri.....	29
3.2.1. Prognostik Genetik Faktörler.....	29
3.2.2. Analiz Yöntemleri	33
3.3. MDS'de Tedavi.....	33

IV. BÖLÜM

4. MYELODİSPLASTİK/MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLER.....	39
4.1. Kronik Myelomonositik Lösemi.....	39
4.1.1. Kronik Myelomonositik Lösemide Tanı	39
4.1.2. Diğer MDS/MPN Grupları.....	41
4.2. MDS/MPN'de Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri.....	41

V. BÖLÜM

5. AKUT MYELOİD LÖSEMİ	47
5.1. Tanı ve Sınıflandırma	47
5.1.1. Farklılaşma ile Tanımlanan AML.....	50

İÇİNDEKİLER

5.2. Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri	50
5.2.1. Prognostik Genetik Faktörler	50
5.2.2. Analiz Yöntemleri	54
5.3. AML'de MRD	55
5.4. AML'de Tedavi	55

VI. BÖLÜM

6. KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ.....	65
6.1. Tanı	65
6.2. Evreleme	65
6.3. Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri	65
6.3.1. Prognostik Genetik Faktörler	66
6.3.1.1. Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region (IGHV) Mutasyonları	66
6.3.1.2. Kromozomal Anomaliler	68
6.3.1.2.1. Kromozomal Anomaliler İçin Laboratuvar Uygulama Önerileri	68
6.3.1.3. <i>TP53</i> gen Mutasyonları	69
6.3.1.3.1. <i>TP53</i> Mutasyon Analizleri İçin Laboratuvar Uygulama Önerileri	69
6.3.1.4. Diğer Gen Mutasyonları	70

VII. BÖLÜM

7. AKUT LENFEBLASTİK LÖSEMİ.....	79
7.1. Tanı ve Sınıflandırma	79
7.2. B-ALL'de Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri	79
7.2.1. Prognostik Genetik Faktörler	79
7.2.1.1. Hipodiploid Karyotip	82
7.2.1.2. Hiperdiploid Karyotip	83
7.2.1.3. <i>KMT2A</i> Yeniden Düzenlenmeleri	84
7.2.1.4. <i>ETV6::RUNX1</i> -altı Tipi ve <i>ETV6::RUNX1</i> -like ALL	84
7.2.1.5. <i>iAMP21</i>	85
7.2.1.6. <i>BCR::ABL1</i> ALL	85
7.2.1.7. <i>BCR::ABL1</i> -like ALL	86
7.2.1.8. <i>t(1;19)</i> ve <i>t(17;19)</i>	86
7.2.2. Kromozomal Anomaliler İçin Laboratuvar Uygulama Önerileri	87
7.3. T-Akut Lenfoblastik Lösemi	88
7.3.1. Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri	88
7.3.1.1. Prognostik Genetik Faktörler	88
7.3.1.2. Kromozomal Anomaliler İçin Laboratuvar Uygulama Önerileri	89

İÇİNDEKİLER

VIII. BÖLÜM

8. MULTİPL MYELOMA.....	95
8.1. Tanı ve Sınıflandırma	95
8.2. Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri	95
8.2.1. Prognostik Genetik Faktörler	95
8.2.2. Analiz Yöntemleri	96

IX. BÖLÜM

9. HEMATOLOJİK MALİGNİTELERDE YENİ NESİL DİZİ ANALİZLERİNİN KULLANIMI	109
Minimal Rezidüel Hastalık Takibi ve YND	113
9.1. Akut Myeloid Lösemi	113
9.2. Myelodisplastik Neoplaziler	114
9.3. Myeloproliferatif Neoplaziler	114
9.4. Multipl Myeloma.....	116
9.5. Kronik Lenfositik Lösemi	116
9.6. Akut Lenfoblastik Lösemi	116

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR

KML tanı ve takibinde kullanılan genetik testlere yönelik öneriler (NCCN)	6
Myeloproliferatif neoplaziler.....	15
MPN'de diagnostik WHO kriterleri	16-17
JAK2, MPL ve CALR mutasyonlarının klinik bulgulara göre sıklığı	21
Myelodisplastik neoplazilerin sınıflandırılması ve tanımlayıcı özellikleri.....	30
Çocukluk çağı myelodisplastik neoplaziler	31
MDS sitogenetik skorlama sistemi	31
IPSS-M prognostik risk şemasında yer alan gen mutasyonları.....	32
MDS/MPN grubunun sınıflandırması	39
Kronik myelomonositik lösemi tanı kriterleri	40
MDS/MPN'de saptanan mutasyonlar ve tedavi seçenekleri	41
KMML'de analiz edilmesi önerilen gen mutasyonları	42
Akut myeloid lösemi WHO sınıflandırması	48
AML-MR'de diagnostik genetik anomaliler	49
Farklılaşma ile tanımlanan AML'de diagnostik kriterler	51-52
Tanıda saptanan genetik anomalilerin ELN'ye göre risk sınıflandırması	53
AML'de tanı anında ELN tarafından önerilen testler	56
MRD analiz yöntemleri	57
KLL'de driver mutasyonlar	71
B-hücreli lenfoid proliferasyonların sınıflandırması	80
B-ALL'de sitogenetik ve moleküler prognostik risk sınıflandırması	81
Hipodiploide yakın karyotipli ALL'de gözlenen mutasyonlar	82
Düşük hipodiploid karyotipli ALL'de gözlenen mutasyonlar	83
MM'de primer moleküler sitogenetik sınıflandırma	96
Sitogenetik anomaliler ile klinik bulgular ve prognoz arasındaki ilişki	97
MM'de standart risk faktörleri ve RISS	98
Mayo Clinic Risk sınıflandırması (mSMART)	98
Sanger sekans, qPCR ve YND kullanım alanları, avantajları ve dezavantajları	110
Kanserde sekans varyantlarının yorumlanması ve raporlanması	111
Somatik sekans varyantlarının analizinde kullanılan güncel veritabanları	112
Konvansiyonel yöntemler ile değerlendirilen genler ve saptanan varyantlar.....	113
Myelodisplastik neoplazilerde incelenmesi önerilen genler ve bu genlerde sık izlenen mutasyonlar	115

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL

KLL'de prognostik genetik faktörler	66
---	----

ALGORİTMALAR

KML tanılı hastalarda genetik tanı algoritması	9
MPN tanılı hastalarda genetik tanı algoritması.....	24
MDS tanılı hastalarda genetik tanı algoritması	35
MDS/MPN tanılı hastalarda genetik tanı algoritması.....	43
AML tanılı hastalarda genetik tanı algoritması	60
KLL tanılı hastalarda genetik tanı algoritması.....	73
ALL tanılı hastalarda genetik tanı algoritması.....	91
MM tanılı hastalarda genetik tanı algoritması	101

ÖNSÖZ

Değerli Tıbbi Genetik ve Türk Hematoloji Derneği Mensupları,

Kanserin her geçen gün arttığı bir zaman diliminde hematolojik malignitelerde de önemli artışlar olduğunu biliyoruz. Özellikle hematolojik malignitelerin tanısında, takibinde, tedavi planlaması ve klinik yönetiminde genetik testlerin önemi her geçen gün artmaktadır. Kemoterapi gibi konvansiyonel tedavi yaklaşımlarından uzaklaşarak hedefli tedaviler, immünoterapiler ve daha ileri tedavi yöntemlerinin hasta yönetiminde önemli yer aldığı günümüzde genetik biyobelirteçler bütün bu tedavi yöntemlerinin yol haritasını oluşturmaktadır. Bu bağlamda disiplinler arası ortak çalışmalar hasta faydası için kat edilen mesafeleri kısaltacaktır. Hematolojik malignitelerde genetik metod ve biyobelirteçlerin irdelendiği bu kılavuzun hazırlanmasında emeği geçen Prof. Dr. Beyhan Durak Aras'a ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na teşekkür ederim. Kılavuzun hematogenetik alanı ile ilgilenenlere rehber olması dileklerimle.

Doç. Dr. Taha Bahsi

Tıbbi Genetik Derneği Başkanı

ÖNSÖZ

Türk Hematoloji Derneği ve Tıbbi Genetik Derneğinin Kıymetli Üyeleri,

Hematolojik hastalıkların tanı, takip ve tedavilerinin yönetiminde genetik ve moleküler belirteçlerin önemi her geçen gün daha da artmakta ve söz konusu belirteçlerin tayini teknolojik gelişmeler sayesinde hasta takibinin vazgeçilmez bir parçası haline gelmektedir. Günümüzde hastalıklar moleküler bozukluklara göre sınıflanmakta; prognozları belirlenmekte ve tedavi açısından değerlendirilmektedir.

Katlanarak artan bilgi, hızla değişen sınıflamalar ve geliştirilen hedefe yönelik yeni tedaviler arasında sıkışan klinisyenlerin akılcı kararlar alabilmesi ve uygulayabilmesi için mevcut bilimsel kanıtlar çerçevesinde oluşturulmuş algoritmalar ve rehberler büyük önem taşımaktadır.

Türk Hematoloji Derneği Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Bilimsel Alt Komitesi Başkanlığını yürüten Prof. Dr. Beyhan Durak Aras önderliğinde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nın kıymetli Öğretim Üyeleri tarafından kaleme alınan ve genetikçi gözünden hematolojik kanserlerde güncel moleküler tanı algoritmaları sunan elinizde tuttuğunuz bu rehber aynı zamanda hematoloji alanının multidisipliner çalışma özelliğini de ortaya çıkaran örnek bir çalışma. Türk Hematoloji Derneği ve Tıbbi Genetik Derneği tarafından desteklenen bu eserin konu ile ilgilenen tüm hekim ve araştırmacılara yol gösterici olacağına inanıyorum.

Katkı sunan herkese teşekkür ederim.

Prof. Dr. Muhlis Cem Ar

Türk Hematoloji Derneği Başkanı

ÖNSÖZ

Hematolojik neoplazmalardaki klonal anomalilerin belirlenmesi neoplastik ve/veya premalign bir hastalığın patofizyolojisinin ortaya konması, hastalık tanısı, hastalık prognozunun belirlenmesi ve tedavi seçimi için önemlidir. Lösemilerin birçoğu genetik anomaliler ile ilişkilidir ve bu anomaliler; karakteristik, tekrarlayan ve edinilmiş anomalilerdir. Tedavi kararının verilmesi için de her gün artan sayıda hastalıkta genetik sonucun bilmesi zorunludur. Tanının değeri aynı zamanda hastaların prognozunu değiştirebilecek terapötik seçenekleri de gündeme getirmiştir. Bu nedenle hedefe yönelik tedaviler ne kadar çok kullanılabilir hale gelirse, kapsamlı tanılama gereksinimi o kadar büyük olmayacaktır. Günümüzde tanı açısından bakıldığında artık her bir hastanın karyotip/genotipinin oldukça detaylı bir karakterizasyonu hedeflenmektedir. Bu nedenle tüm genetik tanı yöntemlerinin en efektif şekilde kullanılması, sonuçlarının doğru yorumlanması, Tıbbi Genetikçi ve Hematologlar ile karşılıklı tartışılabilmesi gerekmektedir. Hazırladığımız bu kılavuzda yer alan hastalıkların genetik tanısı ve algoritmasının anlaşılması ve doğru uygulanabilmesi amaçlanmaktadır. Günümüzde genetik tanının gelişimi ve değişimi baş döndürücü bir hızla devam etmektedir. Bu dinamik süreci de takip eden ve sürekli gelişmeye açık olan kılavuzun ilk sürümünü hazırlamış olmaktan çok mutluyuz. Kılavuzun hazırlanmasında görev alan başta “Dr. Sevgi Işık” ve “Uzm. Bio. Gülçin Günden” olmak üzere “Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Öğretim Üyeleri’ne”, desteklerini esirgemeyen “Tıbbi Genetik Derneği Yönetim Kurulu” ve “Türk Hematoloji Derneği Yönetim Kurulu’na”, yıllardır örneklerini değerlendirdiğimiz bu sayede edindiğimiz tüm deneyimlerle “Bilime Katkı Sağlayan Tüm Hastalara” teşekkürü bir borç biliriz.

Temmuz 2024

Prof. Dr. Beyhan Durak Aras

**Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi
Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Bilimsel Alt Komitesi Başkanı**

KISALTMALAR

AACR	: American Association for Cancer Research
ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
AML	: Akut myeloid lösemi
AML-MR	: Myelodisplazi-ilişkili AML
APL	: Akut promyelositik lösemi
ASCT	: Otolog kök hücre nakli
ASO-PCR	: Allel-spesifik oligonükleotid polimeraz zincir reaksiyonu
bZIP	: Basic leucine zipper
cDNA	: Complementary DNA
CLL-IPI	: CLL international prognosis index
cMDS	: Childhood MDS
cMDS-LB	: Childhood MDS with low blasts
CNLOH	: Copy neutral loss of heterozygosity
CPT	: Trisodium citrate/pyridoxal 5'-phosphate/Tris
Del	: Delesyon
dPCR	: Dijital PCR
EDTA	: Ethylenediamine tetraacetic acid
ELN	: European LeukemiaNet
ERIC	: European Research Initiative on CLL
ESA	: Ek sitogenetik anomaliler
ET	: Esansiyel trombositemi
FDA	: U.S. Food and Drug Administration
FFPE	: Formalin-fixed paraffin-embedded
FLC	: Free light chain
gDNA	: Genomic DNA
GIPSS	: Genetically Inspired Prognostic Scoring System
HMA	: Hipometilleyici ajanlar
HMR	: Çok yüksek risk mutasyonları
IGHV	: Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region
IMGT/V-QUEST	: International ImMunoGeneTics information system
IMWG	: International Myeloma Working Group
IPSS	: International Prognostic Scoring System
IPSS-M	: Molecular-International Prognostic Scoring System
IPSS-R	: Revised-International Prognostic Scoring System
IS	: International scale
ISS	: Tümör yükü
iFISH	: Interphase FISH
JMML	: Juvenil myelomonositik lösemi

KISALTMALAR

KIT	: Kemik iliği transplantasyonu
Ki	: Kemik iliği
KLL	: Kronik lenfositik lösemi
KML	: Kronik myeloid lösemi
KMML	: Kronik myelomonositik lösemi
KSA	: Klonal sitogenetik aberasyon
LOH	: Loss of heterozygosity
MDS	: Myelodisplastik neoplazma
MDS/MPN	: Myelodisplastik/myeloproliferatif neoplazma
MDS-F	: Fibrosis MDS
MDS-h	: Hypocellular MDS2
MDS-IB	: Increased blasts MDS
MDS-LB	: Low blasts MDS
MFC	: Multiparameter flow cytometry
M-IGHV	: Mutated IGHV
MIPSS70	: Mutation-Enhanced International Prognostic Scoring System 70
MM	: Multipl myeloma
MMY	: Majör moleküler yanıt
MPN	: Myeloproliferatif neoplazma
MRD	: Minimal rezidüel hastalık
MRI	: Magnetic resonance imaging
mSMART	: Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy
MYSEC-PM	: Myelofibrosis Secondary to PV and ET-Prognostic Model
NCCN	: National Comprehensive Cancer Network
NGS	: Yeni nesil sekanslama
NIH	: National Institutes of Health
OS	: Overall survival
PFS	: Progresyonsuz yaşam süresi
Ph	: Philadelphia kromozomu
PK	: Periferik kan
PMF	: Primer myelofibrozis
PV	: Polistemi vera
RCC	: Refrakter sitopeni
RCM	: Red cell mass
RISS	: Revised International Staging System
RT-PCR	: Real-time PCR
RT-qPCR	: Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
SA	: Sitogenetik anomali

KISALTMALAR

smbZIP	: Basic leucine zipper (bZIP) monoallelik mutasyonları
T-ALL	: T-hücreli ALL
TCR	: T-cell receptor
TKI	: Tyrosine kinase inhibitor
TSY	: Tam sitogenetik yanıt
TTP	: Time to progression
TTT	: Time to treatment
UM-IGHV	: Unmutated IGHV geni
VAF	: Variant allele frequency
VHR	: Çok yüksek riskli karyotip
vPh	: Varyant Ph
WBPS	: WHO classification-based Prognostic System
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)

HEMATOLOJİK
MALİGNİTELERDE GENETİK
ALGORİTMA KILAVUZU

I.
BÖLÜM

KRONİK MYELOİD LÖSEMİ

Yazarlar:

Gülçin Günden
Beyhan Durak Aras



1. KRONİK MYELOİD LÖSEMI

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yaptığı myeloid maligniteler sınıflandırmasında kronik myeloid lösemi (KML), myeloproliferatif neoplaziler (MPN) grubu içerisinde yer almaktadır. Bu bölümde MPN grubunda yer alan hematolojik malignitelerden sadece KML'ye yer verilecektir.

KML, erişkin lösemilerin ~%15'ini oluşturan klonal hematopoetik kök hücre hastalığı olarak tanımlanmaktadır. KML görülme yaşı ortalama 56'dır. KML'de hematopoetik hücrelerin genomunda değişimler meydana gelmekte olup, bu değişimler, granülositlerin kemik iliğinde (Kİ) aşırı çoğalmasına sebep olmakta ve hastalarda splenomegali ve hiperlökositöz gelişmektedir. Sitogenetik seviyede ise, KML Philadelphia (Ph) kromozomunun varlığı ile karakterizedir (1).

1.1. Tanı

KML tanı koymak için dirençli ve açıklanamayan lökositöz (veya nadiren trombositöz) gözlenmesi ve moleküler genetik, floresan in situ hibridizasyon (FISH) veya rutin konvansiyonel sitogenetik ile Ph kromozom anomalisi tespit edilmesi gerekmektedir (2).

KML kronik faz, akselere faz ve blast faz olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.

Kronik Faz

- Akselere ve blast faz özellikleri göstermeyen durum olarak kabul edilmektedir.

Akselere Faz

- Kan veya Kİ'de blastların oranı %15-29 veya %30 blast olan kan veya Kİ'de promyelositler,
- Kanda >%20 bazofil,
- Terapiden bağımsız $<100 \times 10^9/L$ dirençli trombositemi,
- Ph pozitif [Ph(+)] hücrelerde [klonal sitogenetik aberasyon (KSA)/Ph(+)] klonal kromozom anomalilerin saptanması olarak tanımlanmaktadır.

Blast Faz

- Kİ veya kanda >%30 blast (veya WHO-HAEM5 göre >%20 blast),
- Dalak haricinde ekstramedüller blast proliferasyonunun saptandığı fazdır (3).

1.2. Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri

1.2.1. Prognostik Genetik Faktörler

1.2.1.1. Kromozomal Anomaliler

Ph kromozomu, 9 ve 22. kromozomun dengeli resiprokal translokasyonu [t(9;22)] sonucu oluşmakta ve KML hastalarının >90'ında saptanmaktadır. Bu translokasyon sonucunda, kromozom 22'de lokalize breakpoint cluster region (BCR) ve kromozom 9'daki abelson (ABL) proto- onkogeni füzyon gen oluşturmaktadır. Oluşan füzyon genin proteini, yüksek tirozin kinaz aktivitesi göstermekte ve tümörögenез sürecini başlatmaktadır (4).

Ayrıca, KML hastaları için Ph kromozomu tanı koydurucu olup, tyrosine kinase inhibitör (TKI) duyarlılığı nedeniyle de iyi prognostik bir belirteç olarak kabul edilmektedir.

KML hastalarının %5-10'unda Ph kromozomunun varyasyonları (vPh) tespit edilmektedir (5). Bu vPh kromozomları one ve two step mekanizmalarıyla oluştuğu, bunun sonucunda ise basit ve kompleks yeniden düzenlemelerin meydana geldiği belirtilmektedir (6). Kompleks yeniden düzenlenmeler, 9 ve 22. kromozomlara ek üçüncü bir kromozomun daha translokasyona dahil olmasıyla meydana gelmektedir. Kompleks yeniden düzenlenmeler içerdiği kromozom sayısına göre; 3'lü, 4'lü ve 5'li-yol olarak isimlendirilmektedir. Genellikle vPh kromozomları prognozu olumsuz yönde etkilemediği ve özellikle KML'nin kronik faz evresinde saptandığı bilinse de, bazı yayınlarda TKI direncine neden olduğu bilinmektedir (5,7).

KML hastalarının metafazlarında t(9;22), genellikle tek anomali olarak saptanmasına rağmen, hastaların %15'inde ek sitogenetik aberasyonlar (ESA) saptanmaktadır. Bu aberasyonların genomik instabiliteye ve klonal evolüsyona sebep olması nedeniyle prognozu olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. ESA'lar, en sık blast fazında gözlenmektedir. Özellikle, kronik faz KML hastalarında saptanan ESA'ların blast faz progresyonuna sebep olduğu belirtilmektedir. Bazı KML olgularında Ph negatif [Ph(-)] klonlarda, klonal sitogenetik aberasyon (KSA) saptanmaktadır. KSA'lar, ESA'lar gibi klonal evolüsyona katkı sağlamakta ve prognozu olumsuz yönde etkilemektedirler. Bu aberasyonların TKI tedavisinden sonra geliştiği ifade edilmekte ve ileri evre KML hastalarında daha sık görüldüğü belirtilmektedir (8,9).

1.2.1.2. Moleküler Anomaliler

KML'de, *BCR* ve *ABL1* geninde kırıklar genellikle intronik bölgelerde meydana gelmektedir. *ABL1* gen kırık noktaları, özellikle ekson 1b (upstream) ve 1a (downstream) arasında; *BCR* kırıkları ise genellikle M-BCR bölgesinde olmaktadır.

M-BCR, ekson e1 ve e2 arasında ya da e14 ve e15 arasından gerçekleşmektedir. Ayrıca KML'de nadir olarak meydana gelen m-BCR bölge kırığı ekson e1 ve e2; μ -BCR bölge kırığı ise ekson e9 ve e20 arasında olduğu görülmektedir. *BCR::ABL1* arasındaki bu rekombinasyonun, çeşitli hibrid mRNA üretimine sebep olduğu kabul edilmektedir. Örneğin; M-BCR bölgesindeki kırık sonucunda b3a2 olarak isimlendirilen e14a2 (ekson 14 BCR ve ekson a2 ABL1) transkripti ve b2a2 olarak isimlendirilen e13a2 (ekson e13 BCR ve ekson a2 BCR) transkripti oluşmaktadır. Bu varyantlar, KML'de tipik p210 proteinini kodlamaktadır. m-BCR kırıkları sonucunda p190 proteinini kodlayan e1a2 transkriptine, u-BCR ise p230 proteinini kodlayan e19a2 transkriptini ortaya çıkarmaktadır (10).

Bazı KML hastalarında, TKI'lara karşı direnç mekanizması gelişmektedir. Bu direnç mekanizması, *BCR::ABL1* geninde meydana gelen nokta mutasyonlarıyla ilişkilendirilmektedir. Özellikle, *BCR::ABL1* nokta mutasyonları TKI-dirençli KML hastalarının %12-63'ünde görülmektedir. KML hastalarında >90 farklı nokta mutasyonu tanımlanmıştır. Özellikle bu mutasyonlar T315, Y253, E255, M351, G250, F359, ve H396 gibi aminoasit lokalizasyonlarında meydana gelmektedir. Tirozin kinaz inhibitörü tedavisi sırasında yeni oluşan mutasyonların, tam sitogenetik yanıt (TSY) kaybı; blast faz progresyon süresinin kısalması; kısa progresyonsuz sağkalım ve overall survival öngörülmesinde önemli bir faktör olduğu bilinmektedir (11).

Konvansiyonel sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler tetkiklerin kullanılmasına yönelik bazı öneriler Tablo 1.1'de yer almaktadır.

Tüm bunlara ek olarak KML hasta grubunda, tanı anında *BCR::ABL1* haricinde, birçok kanser çeşidi ile ilişkili genlerde de mutasyonlar (*ASXL1*, *RUNX1*, *IKZF1*, *TET1/2*, *IDH1/2*, *JAK2*, *DNMT3A/3B*, *EZH2*, *WT1*, *NPM1*, *NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *BCOR*, *CREBBP*, *TP53*) saptanabilmektedir. Akselere veya blast fazda olan KML hastalarında ise *IKZF1* ekson delesyonları ve *ASXL1*, *RUNX1* ve *BCOR* genlerinde mutasyonlar yüksek sıklıkta meydana gelmektedir. Fakat *IDH1/2* gen mutasyonlarının sıklığının düşük olduğu gözlenmiştir. *IKZF1* ve *RUNX1* değişimleri hücre farklılaşmasını etkilemekte; kronik faz KML'nin, blast faz KML'ye progresyonunda önemli bir biyomarker olduğu belirtilmektedir. *BCR::ABL1* bağımsız gen mutasyonları, yeni nesil sekanslama ile myeloid gen mutasyon panelleri kullanılarak saptanabilmektedir.

1.2.2. Analiz Yöntemleri

- Konvansiyonel sitogenetik analizlerin mutlaka tanı anında yapılması önerilmektedir. Özellikle tanıda, ESA'ların dışlanması için en az 20 metafaz plağının incelenmesi gerekmektedir.

Tablo 1.1. KML tanı ve takibinde kullanılan genetik testlere yönelik öneriler (NCCN)

Test	Öneri
Kemik iliği sitogenetik	• Tanıda • Yanıt aşamalarına ulaşmada başarısızlık durumunda • Hematolojik yanıt kaybında herhangi bir belirteç • Herhangi bir TSY kaybı veya <i>BCR::ABL1</i> transkriptinde >%1 artış olarak tanımlanan moleküler yanıt
IS kullanılarak RT-qPCR	• Tanıda • İlk tedaviden sonra her 3 ayda bir yapılmalı. <i>BCR::ABL1</i> (IS) $\leq$%1 (MR2,0)² başarısına ulaştıktan sonra, 2 yıl süresince her 3 ayda ve daha sonra her 3-6 ayda bir • Majör moleküler yanıt (MMY) ile <i>BCR::ABL1</i> transkript seviyesinde 1-log artış varsa, RT-qPCR 1-3 ayda tekrarlanmalı
<i>BCR::ABL1</i> kinaz domain mutasyon analizi	• Kronik faz • Yanıt aşamalarına ulaşmada başarısızlık • Hematolojik yanıt kaybında herhangi bir belirteç • Herhangi bir TSY kaybı belirtisi veya <i>BCR::ABL1</i> transkriptinde >%1 (MR2,0) artış olarak tanımlanan moleküler yanıt • MMY kaybı ve <i>BCR::ABL1</i> transkript seviyesinde 1-log artışı • Akselere veya blast fazında hastalık progresyonu
TSY: Tam sitogenetik yanıt, IS: International scale, MMY: Majör moleküler yanıt	

- Kromozom analizinde vPh tespit edildiği zaman, FISH ve quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) ile *BCR::ABL1* varlığının konfirmasyonu yapılmalıdır.

- *BCR::ABL1* FISH probu ile hızlı sonuç almak için direkt kültür veya yayma preparatlar kullanılabilir. Ayrıca daha güvenilir ve bilgilendirici sinyal paterni değerlendirmek için dual füzyon problemlerinin kullanımı önerilmektedir.

- FISH testi sitogenetik olarak kriptik olan anomalilerin tespit edilmesinde önemli olup, özellikle normal karyotip gözlenen olgulara ve metafaz yetersiz olduğu durumda yapılması gerekmektedir.

- Tanı anında Kİ ve kan örneklerinde yapılan FISH analizlerinin yüksek oranda uyumluluk göstermesi sebebi ile iki numunede kullanılabilir (FISH çalışmalarının, kullanılan proba bağlı olarak %1-5 “yanlış pozitiflik” oranına sahip olduğu unutulmamalıdır).

- KML hastalarında FISH yöntemi ile *BCR::ABL1* tespit edilmezse, KML tanısının hala klinik olarak şüpheli olduğu unutulmamalıdır. Bu yüzden RT-qPCR veya diğer myeloproliferatif hastalık ile ilişkili mutasyonların değerlendirilmesi önerilmektedir.

- Sitogenetik olarak tedavi yanıtı; TSY alınana kadar 3, 6, ve 12. ay sonunda ve 20≤ metafaz ile değerlendirilmelidir. Fakat tanı anında ESA saptanan olguların, tedaviye yanıtlarının olumsuz olacağından dolayı daha sık takip edilmesi önerilmektedir.

- Hastalarda kriptik *BCR::ABL1* mevcutsa, mutlaka FISH ve moleküler yöntemlerle takibi yapılmalıdır. Sitogenetik ile TSY alınan olguların takibi FISH ile yapılabilir. Fakat tanı anında, kriptik t(9;22) saptanması durumunda, FISH çalışması sonucunda tek füzyon sinyal paterni saptanan olguların, FISH yöntemi ile takipleri konusunda dikkatli olunmalıdır. RT-qPCR metodu standardize ve Uluslararası Ölçeğine [(IS) *International Scale*] göre ifade ediliyorsa; daha sonraki yanıt durumu sadece RT-qPCR ile değerlendirilir. Takip için, periferik kan örneklerinin tedavi yanıtının değerlendirilmesinde daha uygun olduğu bildirilmiştir.

- *BCR::ABL1* transkriptlerini saptamak için, RT-qPCR kullanılmaktadır. RT-qPCR, *BCR* ve *ABL1* splice bölgeyi amplifiye etmek için kullanılmaktadır. Ayrıca RT-qPCR, minimal rezidüel hastalığı saptamada yüksek sensitivite göstermektedir. İlgili yöntemin, FISH ve sitogenetiğe göre 2 ve 3 log daha duyarlı olduğu belirtilmektedir (1/100.000 nükleus). Ayrıca National Institutes of Health Consensus Group, KML hastalarında *BCR::ABL1* transkript düzeylerinin RT-qPCR izlenmesini standart hale getirmek için IS oluşturmuşlardır.

- Analiz öncesindeki en önemli aşama, RNA ekstraksiyonun kalitesidir. Ulaşılabilmesi durumunda RNA-stabilizasyonu sağlayan tüplerin kullanımı önerilmektedir. Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) tüpleri de rutinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ekstraksiyon metoduna bağlı olarak RNA kalitesinin de değişkenlik göstereceği unutulmamalıdır.

- PCR dayalı yöntemlerde yanlış pozitif ve negatif sonuçlar alınabilmektedir. Yanlış-negatif sonuçlar düşük-kalite RNA veya reaksiyon başarısızlığı; yanlış-pozitif sonuçlar ise kontaminasyon kaynaklı olabileceği unutulmamalıdır. Ayrıca bazı örneklerdeki 0,5-1 log farklılığı, test prosedür, örnek alımı ve laboratuvar deneyimine bağlı olarak meydana gelebilmektedir (2,12).

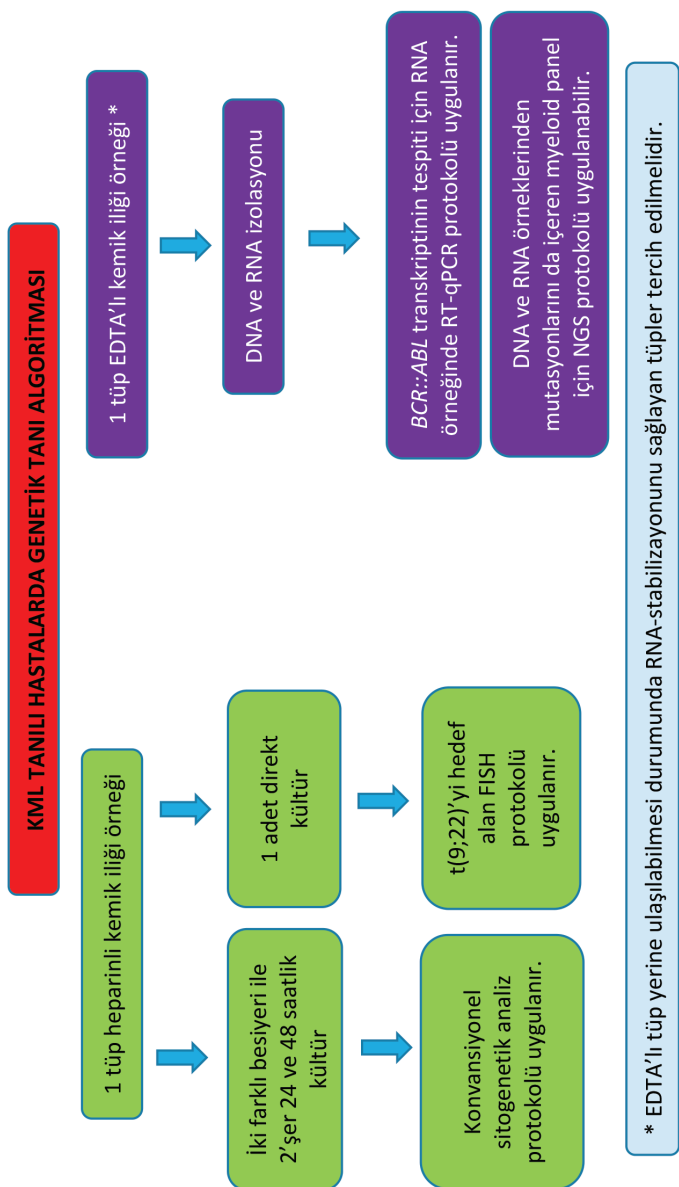
- *BCR::ABL1* mutasyonlarının saptanmasında direkt sekanslama (Sanger), pyrosekanslama, mutasyon spesifik RT-qPCR, Liquefied bead array (Luminex) yöntemleri kullanılabilir (13). Bu mutasyonların analizlerine yönelik öneriler Tablo 1.1'de yer almaktadır.

- Not: DNA ve RNA ölçüm belirsizliği ve yanlışlığında; örnek toplama, lökosit ve RNA preparasyon metot, komplementer DNA sentezinde heterojenite, enzim, primer, kalibratör materyallerin seçimi ve IS dönüştürme metotları gibi durumlar göz önünde bulundurulmalıdır. Tanı anında hangi numune (Kİ veya periferik kan) kullanıldıysa takip sürecinde de aynı numune tercih edilmelidir (12).

- Hasta takibi sürecinde beklenen yanıtın alınamaması durumunda TKİ mutasyonları için analizlerin gerçekleştirilmesi önerilmektedir.

Özet;

- KML'de Ph kromozomu tanısı öneme sahiptir. TKİ'lar ile tedavi uygulanır.
- Ph kromozomlarının %5-10 kadarı varyant olarak gözlenmektedir. Prognostik etkileri ise tartışmalıdır.
- Ph kromozomlarına ek olarak sitogenetik anomali saptanabilmektedir ve bu anomaliler prognozu olumsuz etkilemektedir.
- *ABL* ve *BCR* genlerindeki kırıklık farklılık göstermekte olup, p230, p190 ve 210 proteinlerini kodlanmaktadır.
- TKİ'ya karşı direnç geliştiren mutasyonlar KML olgularının %12-63'ünde gözlenebilmektedir.
- *ASXL1*, *RUNX1*, *IKZF1*, *TET1/2*, *IDH1/2*, *JAK2*, *DNMT3A/3B*, *EZH2*, *WT1*, *NPM1*, *NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *BCOR*, *CREBBP*, *TP53* gen mutasyonları da KML'de tanımlanmıştır.
- KML'de tanı anında muhakkak konvansiyonel sitogenetik test uygulanmalıdır. Sonuçlar FISH ya da RT-qPCR ile konfirme edilmelidir.
- Konvansiyonel sitogenetik test ile en az 20 metafaz örneği değerlendirilmelidir.
- FISH testi metafaz plağının yetersiz olduğu durumlarda da önerilmektedir. En az 100 hücre değerlendirilmelidir.
- FISH testinde *BCR::ABL1* tespiti için çift füzyon problemleri tercih edilmelidir.
- Konvansiyonel sitogenetik ve FISH testleri için heparinli tüplerde örnekler laboratuvara ulaştırılmalıdır.
- Konvansiyonel sitogenetik için kemik iliği örneklerinden 24-48 saatlik kültürler çalışılmalıdır. FISH testi için daha hızlı sonuç almak için direkt kültür ya da yayma preparatları kullanılabilir.
- RT-qPCR yöntemi için kemik iliği ya da periferik kan örnekleri tercih edilebilir. Örnekler EDTA'lı tüpler içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır.
- Ancak elde edilecek RNA kalitesi için RNA-stabilizasyonu sağlayan tüplerin kullanımı önerilmektedir.
- Tanı anında hangi örnek ile çalışıldıysa takiplerde de aynı çeşit örneklerin kullanımına özen gösterilmelidir.



Kaynaklar

1. Qian H, Gang D, He X, Jiang S. A review of the therapeutic role of the new third-generation TKI olverembatinib in chronic myeloid leukemia. *Front Oncol* 2022;12:1036437.
2. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2022 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol* 2022;97:1236-1256.
3. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, Clark RE, Cortes JE, Deininger MW, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Hughes TP, Janssen JJWM, Kantarjian HM, Kim DW, Larson RA, Lipton JH, Mahon FX, Mayer J, Nicolini F, Niederwieser D, Pane F, Radich JP, Rea D, Richter J, Rosti G, Rousselot P, Saglio G, Sauße S, Soverini S, Steegmann JL, Turkina A, Zaritsky A, Hehlmann R. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2020;34:966-984.
4. Benchikh S, Bousfiha A, Hamouchi AE, Soro SGC, Malki A, Nassereddine S. Chronic myeloid leukemia: cytogenetics and molecular biology's part in the comprehension and management of the pathology and treatment evolution. *Egypt J Med Hum Genet* 2022;23:29.
5. Chauffaille Mde L, Bandeira AC, da Silva AS. Diversity of breakpoints of variant Philadelphia chromosomes in chronic myeloid leukemia in Brazilian patients. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015;37:17-20.
6. Shetty D, Talker E, Jain H, Talker J, Patkar N, Subramanian P, Jain H, Bonda A, Punatar S, Gokarn A, Bagal B, Sengar M, Khattry N. Evaluation of cytogenetic response in CML patients with variant Philadelphia translocation. *Asia Pac J Clin Oncol* 2022;18:99-108.
7. Bennour A, Sennana H, Laatiri MA, Elloumi M, Khelif A, Saad A. Molecular cytogenetic characterization of variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia: genesis and deletion of derivative chromosome 9. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;194:30-37.
8. Krishna Chandran R, Geetha N, Sakthivel KM, Suresh Kumar R, Jagathnath Krishna KM, Sreedharan H. Impact of Additional Chromosomal Aberrations on the Disease Progression of Chronic Myelogenous Leukemia. *Front Oncol* 2019;9:88.
9. Işık S, Günden G, Üsküdar Teke H, Akay OM, Oğuz Davutoğlu N, Aslan V, Karagülle M, Özen H, Çilingir O, Artan S, Durak Aras B. The Impact of Cytogenetic Aberrations in the Clonal Evolution of Chronic Myeloid Leukemia: A Single-Center Experience Among 450 Turkish Patients (Cohort Study). *Turk J Haematol* 2022;39:237-244.
10. Izzo B, Gottardi EM, Errichiello S, Daraio F, Baratè C, Galimberti S. Monitoring Chronic Myeloid Leukemia: How Molecular Tools May Drive Therapeutic Approaches. *Front Oncol* 2019;9:833.
11. Tadesse F, Asres G, Abubeker A, Gebremedhin A, Radich J. Spectrum of BCR-ABL Mutations and Treatment Outcomes in Ethiopian Imatinib-Resistant Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *JCO Glob Oncol* 2021;7:1187-1193.
12. Arora R, Press RD. Measurement of BCR-ABL1 transcripts on the International Scale in the United States: current status and best practices. *Leuk Lymphoma* 2017;58:8-16.

13. Jones D, Kamel-Reid S, Bahler D, Dong H, Elenitoba-Johnson K, Press R, Quigley N, Rothberg P, Sabath D, Viswanatha D, Weck K, Zehnder J. Laboratory practice guidelines for detecting and reporting BCR-ABL drug resistance mutations in chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2009;11:4-11.
14. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, Pane F, Müller MC, Ernst T, Rosti G, Porkka K, Baccarani M, Cross NC, Martinelli G. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* 2011;118:1208-1215.

HEMATOLOJİK
MALİGNİTELERDE GENETİK
ALGORİTMA KILAVUZU

II. BÖLÜM

MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLER

Yazarlar:

Gülçin Günden
Oğuz Çilingir



2. MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLER

Klasik Philadelphia kromozomu (Ph) negatif myeloproliferatif neoplaziler (MPN), myeloid hematopoietik kök hücrelerin klonal neoplastik hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Primer myelofibrozis (PMF), esansiyel trombositemi (ET) ve polistemi vera (PV) MPN sınıfında yer almaktadırlar. Özellikle prefibrotik myelofibrozisin ET ve myelofibroze progrese olduğu gözlenmiştir. MPN'ler grubunda yer alan hastalıkların akut myeloid lösemiye transforme olduğu ve konvansiyonel terapiye direnç gösterdiği bilinmektedir (14).

2.1. Tanı ve Sınıflandırma

MPN'lerinin sınıflandırılmasında Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) son güncellemesinde çok büyük değişiklikler yer almamaktadır. Yeni WHO (5. baskı) sınıflandırmasına göre MPN sınıflandırması Tablo 2.1'de yer almaktadır (15).

Tablo 2.1. Myeloproliferatif neoplaziler

Kronik myeloid lösemi

Polistemia vera

Esansiyel trombositemi

Primer myelofibrozis

Kronik nötrofilik lösemi

Kronik eozinofilik lösemi

Juvenil myelomonositik lösemi

MPN NOS (MPN başka şekilde tanımlanmayan)

MPN: Myeloproliferatif neoplazma

Bu bölümde *BCR::ABL1* negatif MPN incelenmiş olup, kronik myeloid lösemiye Bölüm 1'de ayrıntılı yer verilmiştir.

BCR::ABL1 negatif MPN sınıflandırması PV, ET ve PMF arasında ayırım yapmaya dayanır ve bu tanımlar arasındaki ayırım periferik kan bulguları, moleküler veriler ve kemik iliği (KI) morfolojik bulgularının birlikte değerlendirilmesini gerektirir. Bu parametrelerin hiçbirisi tek başına tanısal bir özgülüğe sahip değildir (15). Myeloproliferatif hastalık tanısı için WHO kriterleri Tablo 2.2'de yer almaktadır.

Juvenil myelomonositik lösemi (JMML) erken çocukluk döneminde gözlenen hematopoietik kök hücre kaynaklı bir MPN'dir. Olguların en az %90'ında RAS yolağında bir kontrolsüz aktivasyon söz konusudur. JMML tanısı için *KMT2A* yeniden düzenlenmelerinin ve monozomi 7'nin hariç tutulması gereklidir. Ayrıca RAS yolağını aktive eden gen mutasyonlarının araştırılması gerekmektedir. RAS yolağını aktive

Tablo 2.2. MPN'de diagnostik WHO kriterleri

PV (polistemia vera)	
Majör kriterler	1. Hemoglobin > 16,6 g/dL (erkek) Hemoglobin > 16,0 g/dL (kadın) veya, hematokrit >%49 (erkek) Hematokrit >48 (kadın) veya, artmış red cell mass (RCM)¹ 2. Hipersellüler kemik iliği (eritrosit, granülosit, matür megakaryosit) 3. <i>JAK2V617F</i> ya da <i>JAK2</i> ekson 12 mutasyon varlığı
Minör kriterler	Normalin altında serum eritropoietin seviyesi
PV tanısı için 3 majör kriter ve ya ilk 2 majör kriter ve minör kriterin karşılanması gerekmektedir	
ET (esansiyel trombositemi)	
Majör kriter	1. Platelet sayısı $\geq 450 \times 10^9/L$ 2. Kemik iliğinde megakaryosit proliferasyonu 3. <i>BCR-ABL</i> + <i>KML</i>, <i>PV PMF</i>, <i>MDS</i> veya diğer myeloid neoplaziler için WHO kriterlerini karşılamaması 4. <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> veya <i>MPL</i> mutasyonu
Minör kriter	Klonal marker varlığı veya reaktif trombositoz kanıtının olmaması
ET tanısı için 4 majör kriterin veya ilk 3 majör kriter ve minör kriterin karşılanması gerekmektedir	
prePMF (prefibrotik primer myelofibrosis)	
Majör kriterler	1. Megakaryosit proliferasyonu, retikulin fibrosis > grade 1 olmaksızın, artmış kemik iliği sellüleritesi, granülosit proliferasyonu, sıklıkla azalmış eritropoez 2. <i>BCR-ABL</i> + <i>KML</i>, <i>PV PMF</i>, <i>MDS</i> veya diğer myeloid neoplaziler için WHO kriterlerini karşılamaması 3. <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> veya <i>MPL</i> mutasyonu varlığı veya bu mutasyonların yokluğunda, başka klonal marker¹ veya minör reaktif kemik iliği retikulin fibrosis yokluğu

Tablo 2.2. Devamı	
PV (polistemia vera)	
Minör kriterler	1. Komorbid şartı olmayan anemi 2. Lökositöz $\geq 11 \times 10^9/L$ 3. Ele gelen splenomegali 4. Laktat dehidrogenazın normal değer üzerinde olması
prePMF tanısı için tüm majör kriterlerin ve en az 2 minör kriterin karşılanması gerekmektedir.	
¹ Üç majör klonal mutasyonun yokluğunda (triple negatif) en sık eşlik eden mutasyonların (<i>ASXL1</i> , <i>EZH2</i> , <i>TET2</i> , <i>IDH1/IDH2</i> , <i>SRSF2</i> , <i>SF3B1</i>) araştırılması hastalığın klonitesinin tespit edilmesini sağlar	
Overt PMF (fibrotik primer myelofibrosis)	
Majör kriterler	1. Reticulin ve/veya kollajen fibrosis grade 2 veya 3'ün eşlik ettiği megakaryositik proliferasyon ve atipi varlığı 2. <i>BCR-ABL</i> + KML, PV PMF, MDS veya diğer myeloid neoplaziler için WHO kriterlerini karşılamaması 3. <i>JAK2</i>, <i>CALR</i> veya <i>MPL</i> mutasyonu varlığı veya bu mutasyonların yokluğunda, başka klonal marker veya reaktif myelofibrosis varlığı
Minör kriterler	1. Komorbid şartı olmayan anemi 2. Lökositöz $\geq 11 \times 10^9/L$ 3. Ele gelen splenomegali 4. Laktat dehidrogenazın normal değer üzerinde olması 5. Lökositoblastozis
Overt PMF tanısı için majör kriterlerin tümünün ve en az bir minör kriterin karşılanması gerekmektedir. RCM: Red cell mass, KML: Kronik myeloid lösemi, PV: Polistemi vera, PMF: Primer myelofibrosis, MDS: Myelodisplastik neoplaziler, WHO: Dünya Sağlık Örgütü	

eden gen mutasyonları genellikle *PTPN11*, *NRAS*, *KRAS*, *NF1* veya *CBL* genlerinde tespit edilmektedir. *PTPN11* ve *NF1* mutasyonu pozitif olguların klinik bulguları çok daha agresif seyretmektedir (15,16).

2.2. Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri

Literatürde, MPN için kromozomal aberasyonların değil, gen mutasyonlarının daha ön planda olduğu görülmektedir. MPN'lerde sıklıkla saptanan mutasyonlar hastalık için sürücü özellikte olup, prognoza katkısı göz ardı edilemeyecek düzeydedir. Ayrıca ilgili gen mutasyonlarının hastalık alt tiplerine göre sıklığının değiştiği de bilinmektedir (14).

2.2.1. Prognostik Genetik Faktörler

Janus kinaz-2 (JAK2) V617F mutasyonları, PV hastalarının büyük bir çoğunluğunda (>%90) ve ET, MF hastalarının %60'ında mevcuttur. *JAK2* geninde ekzon 12'de nadir delesyonlar ve insersiyonlar da görülmektedir. *JAK2* ekzon 12 mutasyonları PV hastalarının %2-3'ünde tespit edilmektedir.

Trombopoietin genindeki (*MPL W515L/K*) aktive edici mutasyonlar MF olan hastaların ~%5-8 ve ET olan hastaların ~%1-4'ünde rapor edilmiştir.

Calreticulin (CALR) geninde ekzon 9'da saptanan çerçeve kayması mutasyonları ET ve MF hastalarının ~%20-35'inde (*JAK2-MPL* negatif ET ve MF olan hastaların %60-80'inde) saptanmıştır. Tip 1 (52 bp delesyonlar) ve tip 2 (5 bp insersiyonlar) en sık görülen varyantlar olarak belirtilmektedir. *CALR*-tip 1 mutasyonları MF'de görülürken, *CALR*-tip 2 mutasyonları ise ET hastalarında gözlenmektedir.

MF'de Genetik Faktörler

CALR mutasyonları *JAK2V617F* veya *MPLW515* mutasyonlarından daha iyi bir overall survival (OS) ile ilişkilidir.

MPL mutasyonları tanıda daha yüksek hemoglobin düzeyi ve artmış transfüzyon bağımlılığı ile ilişkilidir. Triple negatif mutasyon durumu (3 driver mutasyon - *JAK2*, *CALR* veya *MPL*) MF hastalarının yaklaşık %10'unda meydana gelmekte ve MF olan hastalarda kötü prognozla ilişkilendirilmektedir.

ASXL1, *EZH2*, *SRSF2*, *TP53*, *IDH1*, *IDH2*, ve *U2AF1* mutasyonları çok yüksek risk (HMR) mutasyonları olarak kabul edilmekte ve kısa OS ve olaysız yaşam süresi ile ilişkilendirilmektedirler. *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2* ve *RAS* mutasyonları yaşam süresi için prediktif özellikte iken, *ASXL1*, *SRSF2*, *IDH1/2* mutasyonları lösemi transformasyonu için prediktiftir.

TET2 ve *TP53* mutasyonları ise en kötü yaşam süresi ve artmış lösemi transformasyon oranı ile ilişkilidir. *U2AF1* mutasyonları ise PMF'de düşük yaşam süresi ile ilişkilidir (17).

PV ve ET'de Genetik Faktörler

JAK2 ekson 12 mutasyonu pozitif PV, *JAK2* V617F mutasyonu pozitif PV'ye göre, tanıda, yüksek hemoglobin seviyesi ve düşük trombosit ve lökosit sayısı ile ilişkilidir. Ancak her iki mutasyon da benzer trombozis, MF'ye veya lösemiye transformasyon ve ölüm oranlarına sahiptirler.

CALR mutasyonu pozitif ET ise *JAK2* mutant ET'den daha genç yaş, erkek cinsiyet, yüksek trombosit sayısı, düşük hemoglobin, düşük lökosit oranı ve düşük trombozis oranı ile karakterizedir. Ancak *MPL* mutasyonu daha fibrotik transformasyon için daha yüksek risk oranı ile ilişkilidir. *CALR* mutasyonlarının OS, myelofibrozis veya lösemik transformasyon üzerinde bir etkisi yoktur.

International Prognostic Scoring System (IPSS), DIPSS ve DIPSS-Plus MF hastalarında risk değerlendirmesinde en sık kullanılan üç prognostik skorum sistemidir. Mutation-Enhanced International Prognostic Scoring System 70 (MIPSS70), MIPSS70-Plus ve Genetically Inspired Prognostic Scoring System (GIPSS) gibi sitogenetik ve mutasyon durumlarını değerlendiren prognostik skorum sistemleri risk sınıflandırmasının iyileştirilmesi için geliştirilmiştir.

IPSS sadece tanı anında kullanılırken, DIPSS dinamik bir modeldir ve hastalık evresinin herhangi bir noktasında kullanılabilmektedir.

PMF'de risk sınıflandırması için MIPSS70 ve MIPSS70 plus 2,0 tercih edilmektedir.

Moleküler testlerin yokluğunda tedavi zamanı DIPSS-Plus kullanılması önerilmektedir. Ayrıca karyotip sonucuna ulaşamıyorsa DIPSS kullanılması önerilmektedir.

Post PV veya post ET MF durumunda Myelofibrosis Secondary to PV and ET-Prognostic Model (MYSEC-PM) risk sınıflandırılmasının kullanılması önerilmektedir.

DIPSS, platelet sayısı $<100 \times 10^9/L$, RBC transfüzyon ihtiyacı ve kötü prognostik karyotipin dahil edilmesi ile DIPSS-plus geliştirilmiştir. Kötü prognostik etkisi olarak kabul edilen sitogenetik anomaliler kompleks karyotip saptanması veya trizomi 8, delesyon 7, monozomi 7, delesyon 5q, monozomi 5, delesyon 12p, inversiyon 3 veya 11q23 yeniden düzenlenmelerinden bir veya ikisinin saptanması durumu olarak tanımlanmaktadır.

MIPSS70-plus 2,0'da ise *HMR* mutasyonları arasında yer alan *U2AF1* Q157 mutasyonu içeren, çok yüksek riskli karyotipte (VHR) değerlendirmeye dahil

edilmektedir. Çok yüksek risk karyotip olarak tanımlanan anomaliler, tek ya da multipl olarak -7, i(17q), inv(3)/3q21, 12p-/12p11.2, 11q-/11q23 ve trizomi 8 ve 9 haricindeki diğer otozomal trizomileri kapsamaktadır.

GISSP ise hem sitogenetik hem de moleküler anomalileri risk sınıflandırmasına dahil etmektedir. Kötü risk karyotip, VHR karyotip, tip1/like *CALR* mutasyonu yokluğu ve *ASXL1*, *SRSF2* veya *U2AF1* Q157 mutasyon saptanması durumu azalmış sağkalım belirteci olarak kabul edilmektedir.

2.2.2. Analiz Yöntemleri

MPN şüphesinde başlangıç olarak klinik muayenenin yanı sıra tam kan sayımı, serum LDH, karaciğer fonksiyon testleri gibi bazı testler yapılması gerekmektedir.

- Başlangıçta kronik myeloid lösemi tanısını dışlamak için floresan in situ hibridizasyon (FISH) veya moleküler olarak periferik kan örneğinden t(9;22) analiz edilir. Varyant Ph saptanmasına olanak vermesi açısından FISH testinin spesifitesi reverse transcription-polymerase chain reaction'a (RT-PCR) göre daha iyidir. Yöntem tercihi merkezlerin deneyimlerine ve tercihlerine göre değişkenlik göstermektedir.

- Ayrıca varyant Ph kromozomu ve ek sitogenetik anomalilerin tespit edilebilmesi için konvansiyonel sitogenetik testler de uygulanmalıdır.

- Tüm hastalarda moleküler test açısından ilk önce *JAK2V617F* mutasyonunun analizi önerilmektedir.

- *JAK2V617F* mutasyonunun negatif çıkması durumunda ET ve MF şüphesi olan hastalarda *CALR* ve *MPL* mutasyonları analiz edilmelidir.

- *JAK2V617F* mutasyonunun negatif çıkması durumunda PV şüphesi olan hastalarda ise *JAK2* ekson 12 mutasyonları analiz edilmelidir.

- Bu analizler için PCR'a dayalı yöntemler kullanılabilir.

- Alternatif olarak, *JAK2*, *CALR* ve *MPL*'yi de içeren multigen yeni nesil sekanslama panelleri tüm hastalar için başlangıçta çalışılabilir (bakınız Bölüm 9).

- V617F allelik yük tanıda önemli prognostik bilgi sağlamaktadır. Ayrıca hastalığın şiddeti (trombotik durum ve sekonder MF progresyon riski) ve fenotipik prezentasyon hakkında bilgi vericidir. İlgili mutasyonun düşük allel yükü olumlu prognostik faktör olarak sunulabilir (17).

- *CALR* mutasyon allel yükü ve hasta fenotipi arasında bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Özellikle *CALR* allel yükü, lökosit ve trombosit sayısı, hemogloblin ve laktat dehidrojenaz seviyeleriyle ilişkili bulunmuştur (18).

Tüm bu testlerin uygulanması konusundaki bazı öneriler;

- *JAK2*, *CALR*, ve *MPL* sürücü genlerinin analizi için periferik kan örneği kullanılmaktadır.

- Multi-target ve yeni nesil sekanslama (NGS) yöntemlerinin cost-effective olduğu için Sequential single-target assays tercih edilmektedir.

- Tabloda özetlenen genlerin tümör yüklerinin prognostik etkileri olmaması sebebiyle raporlanması gerekmemektedir. Fakat düşük allel frekansının raporlanması (<1% *JAK2V617F*) önemlidir. *JAK2V617F* düşük seviyeleri ve MPN fenotipi mevcut ise *CALR* ve *MPL* taraması yapılmalıdır (Tablo 2.3).

- Spesifik *CALR* mutasyonları (tip 1, 52-bp delesyon; tip 2, 5-bp insersiyon; tip-1 benzeri, ve tip 2-benzeri) PMF'deki prognostik değerlerinden dolayı rutin olarak raporlanmalıdır.

- Rutin taramadaki *JAK246/1* haplotipi veya *TERT* polimorfizmlerinin klinik değeri olmadığı, sadece MPN'ye zayıf bir yakınlıkla ilişkili olduğu unutulmamalıdır.

- *JAK2*, *CALR* ve *MPL* taraması dirençli eritrositoz veya trombositoz olan hastalarda çalışılması önerilmektedir (Grade 1B).

Tablo 2.3. *JAK2*, *MPL* ve *CALR* mutasyonlarının klinik bulgulara göre sıklığı

Klinik	Varyant	Sıklık
Eritrositoz	<i>JAK2V617F</i>	%96-97 PV
	<i>JAK2</i> ekzon 12 mutasyonları	~%3 PV
Trombositoz	<i>JAK2V617F</i>	%50-60 ET
	<i>CALR</i> ekzon 9 mutasyon	%25-30 ET
	<i>MPL</i> ekzon 10 mutasyon	%3-11 ET
	<i>BCR::ABL1</i> füzyon	KML'yi dışlamak için
Şüpheli PMF	<i>JAK2V617F</i>	%50-60 PMF
	<i>CALR</i> ekzon 9 mutasyon	%15-35 PMF
	<i>MPL</i> ekzon 10 mutasyon	%6-9 PMF
Şüpheli KML	<i>BCR::ABL1</i> füzyon	%100 KML
PV: Polistemi vera, ET: Esansiyel trombositemi, KML: Kronik myeloid lösemi, PMF: Primer myelofibrozis		

Klinik duruma göre;

- Ek somatik sürücü varyantların frekansları, PMF veya sekonder MF ve/veya diğer MPN veya MDS/MPN blast fazında yüksek olduğu bilinmektedir. National Genomic Test Directories göre minimum çalışması gereken genler *KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *JAK2*, *CALR*, *MPL*, *ASXL1*, *CBL*, *CHEK2*, *CSF3R*, *CUX1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *IKZF1*, *KIT*, *NFE2*, *SF3B1*, *SH2B3*, *SRSF2*, *TET2*, *U2AF1*, *HRAS*, *RUNX1*, *SETBP1* ve *ZRSR2* olarak belirlenmiştir (multi-panel NGS).

- Driver mutasyonları negatif olup, şüpheli MPN hastalarında; Kİ histolojisi ve klinik özellikler olan hastalarda myeloid panel ve sitogenetik analiz yapılması önerilmektedir (17).

Sitogenetik testler;

- Myeloid neoplazilerde sitogenetik analizlerin, Kİ dokusunda yapılması gerekmektedir.

- Hücre kültürü temelli yöntemlerde antikoagülan tüpler olarak heparinli tüpler tercih edilmelidir.

Sitogenetik analizler için alınan Kİ örneklerinin en az 0,5-1 ml olması gerekmekte olup, aspirasyon sonrası örneklerin 24 saat içinde sitogenetik laboratuvarına ulaştırılması gerekmektedir.

- Özellikle eozinofili görülen myeloid neoplazilerde *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* gen yeniden düzenlemeleri veya *PCM1-JAK2* yeniden düzenlenmesini belirlemek için FISH yöntemi (ya da RT-PCR) kullanılabilir.

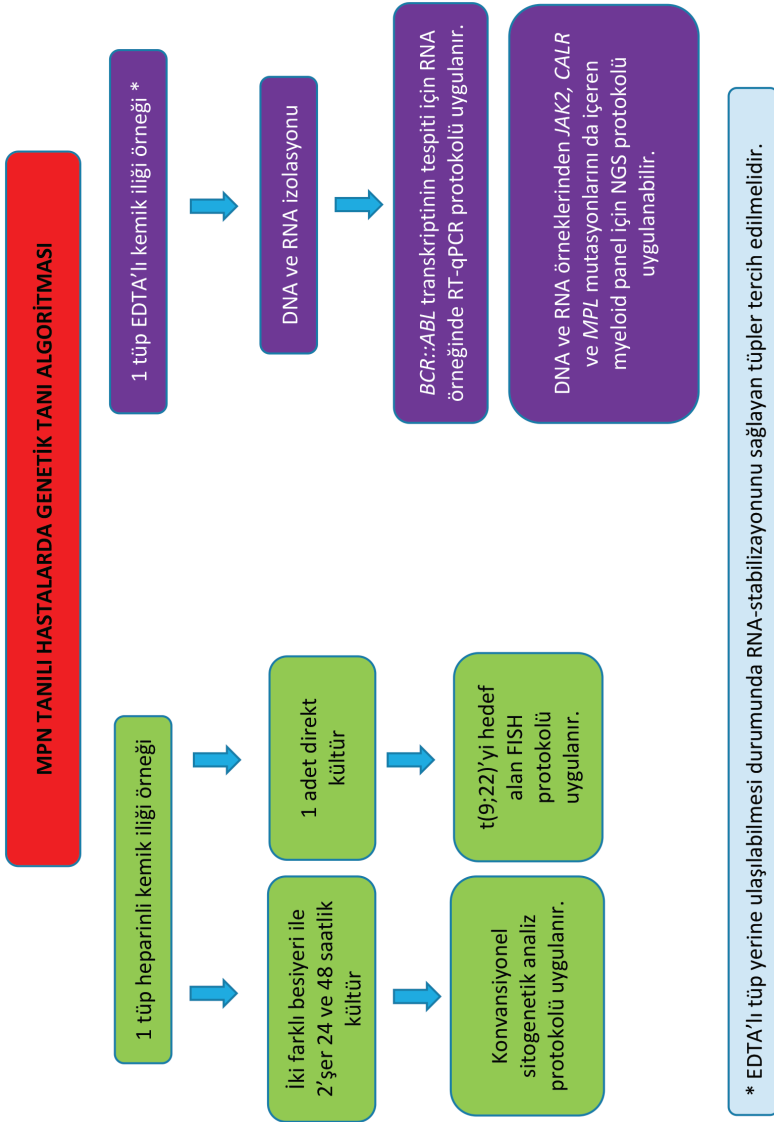
2.3. MPN'de Tedavi

JAK2 mutasyonlarının saptanması durumunda *JAK1* ve *JAK2* inhibitörü olarak etki gösteren ticari ilaçlar tedavide kullanılmaktadır. Yine platelet sayısı $<50 \times 10^9/L$ olan orta ya da yüksek risk MF hastalarında kullanılmak üzere *JAK2*, *FLT3* ve *IRAK1* inhibitörü olan bir ilaç the U.S. Food and Drug Administration (FDA) tarafından onay almıştır.

Tedavi planlamasında, HMR mutasyonlarının saptanması PMF hastalarına allojenik kök hücre transplantasyonu ile ilgili karar vermede etken olabilir (17).

Özet;

- *JAK2V617* mutasyonları PV olgularının %90'ında, ET ve PMF hastalarının %60'ında tespit edilmektedir.
- *JAK2* ekson 12 mutasyonları PV olgularının %2-3'ünde gözlenmektedir.
- *MPL* genindeki mutasyonlar PMF hastalarının %5-8'inde ve ET hastalarının %1-4'ünde saptanmaktadır.
- *CALR* mutasyonları ise ET ve MF hastalarının %20-35'inde gözlenmektedir.
- MF'de *CALR* mutasyonları daha iyi bir OS ile ilişkilidir.
- *JAK2*, *CALR* ve *MPL* gen mutasyonlarının negatif olması (triple negatif) MF'de kötü prognoz ile ilişkilidir.
- *TET2*, *TP53* ve *U2AF1* mutasyonları MF'de kötü prognoz ile ilişkilidir.
- *JAK2* ekson 12 ve *JAK2V617F* mutasyonlarının PV'de MF'ye veya lösemiye dönüşüm ve ölüm oranları ile ilişkileri benzerdir.
- *CALR* mutasyonlarının ET üzerinde OS, MF veya lösemiye dönüşüm açısından etkisi yoktur.
- Prognostik sınıflandırmada IPSS, MIPSS70, MIPSS70-PLUS, GIPSS gibi skorlama sistemleri kullanılmaktadır.
- Tanı anında KML'yi dışlamak için FISH ya da RT-PCR yöntem ile t(9;22) analiz edilir.
- Varyant Ph veya ek sitogenetik anomalilerin tespitinin yapılabilmesi için tanı anında Ki örneğinden konvansiyonel sitogenetik testler de önerilmektedir.
- Tüm hastalarda ilk önce *JAK2V617* mutasyonunun analizi gerçekleştirilmelidir.
- *JAK2V617F* mutasyonlarının negatif çıkması durumunda ET ve MF şüphesi olan olgularda *CALR* ve *MPL* mutasyon analizleri, PV olgularında ise *JAK2* ekson 12 mutasyon analizleri önerilmektedir.
- Ayrıca olgularda *KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *JAK2*, *CALR*, *MPL*, *ASXL1*, *CBL*, *CHEK2*, *CSF3R*, *CUX1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2*, *IKZF1*, *KIT*, *NFE2*, *SF3B1*, *SH2B3*, *SRSF2*, *TET2*, *U2AF1*, *HRAS*, *RUNX1*, *SETBP1* ve *ZRSR2* genlerinde de mutasyon testlerinin yapılması önerilmektedir.



Kaynaklar

1. Greenfield G, McMullin MF, Mills K. Molecular pathogenesis of the myeloproliferative neoplasms. *J Hematol Oncol* 2021;14:103.
2. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, Bejar R, Berti E, Busque L, Chan JKC, Chen W, Chen X, Chng WJ, Choi JK, Colmenero I, Coupland SE, Cross NCP, De Jong D, Elghetany MT, Takahashi E, Emile JF, Ferry J, Fogelstrand L, Fontenay M, Germing U, Gujral S, Haferlach T, Harrison C, Hodge JC, Hu S, Jansen JH, Kanagal-Shamanna R, Kantarjian HM, Kratz CP, Li XQ, Lim MS, Loeb K, Lohgavi S, Marcogliese A, Meshinchi S, Michaels P, Naresh KN, Natkunam Y, Nejati R, Ott G, Padron E, Patel KP, Patkar N, Picarsic J, Platzbecker U, Roberts I, Schuh A, Sewell W, Siebert R, Tembhare P, Tyner J, Verstovsek S, Wang W, Wood B, Xiao W, Yeung C, Hochhaus A. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022;36:1703-1719.
3. Mayerhofer C, Niemeyer CM, Flotho C. Current Treatment of Juvenile Myelomonocytic Leukemia. *J Clin Med* 2021;10:3084.
4. Gerds AT, Gotlib J, Ali H, Bose P, Dunbar A, Elshoury A, George TI, Gundabolu K, Hexner E, Hobbs GS, Jain T, Jamieson C, Kaesberg PR, Kuykendall AT, Madanat Y, McMahon B, Mohan SR, Nadiminti KV, Oh S, Pardanani A, Podoltsev N, Rein L, Salit R, Stein BL, Talpaz M, Vachhani P, Wadleigh M, Wall S, Ward DC, Bergman MA, Hochstetler C. Myeloproliferative Neoplasms, Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2022;20:1033-1062.
5. Palumbo GA, Stella S, Pennisi MS, Piroso C, Fermo E, Fabris S, Cattaneo D, Iurlo A. The Role of New Technologies in Myeloproliferative Neoplasms. *Front Oncol* 2019;9:321.

HEMATOLOJİK
MALİGNİTELERDE GENETİK
ALGORİTMA KILAVUZU

III. BÖLÜM

MYELODİSLASTİK NEOPLAZİLER

Yazarlar:

Sevgi Işık

Beyhan Durak Aras



3. MYELODİSPLASTİK NEOPLAZİLER

Eski adıyla myelodisplastik sendrom olarak bilinen myelodisplastik neoplaziler (MDS) kemik iliği kök hücrelerinin normal kan hücrelerine dönüşememesi ile karakterize bir hastalıktır. MDS'lerin akut myeloid lösemiye (AML) dönüşüm riski yüksektir ve MDS'de %37 oranında 5 yıllık sağkalım bildirilmektedir (19).

3.1. Tanı ve Sınıflandırma

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) MDS sınıflandırmasında yaptığı en son güncellemesinde (5. baskı) MDS'nin myelodisplastik neoplaziler olarak isimlendirilmeleri neoplastik yapılar a vurgu yapmakta ve myeloproliferatif neoplaziler (MPN) ile terminolojiyi uyumlu hale getirmektedir. Bu yeni sınıflandırmada MDS genetik anomalilere ve morfolojik özelliklere göre sınıflandırılmaktadır (Tablo 3.1).

Sınıflandırmada yapılan yeni güncellemelerde, MDS-5q sınıfında herhangi bir değişiklik yapılmamıştır. *SF3B1* veya *TP53* mutasyonları (çoklu vuruş olmayan) MDS-5q olarak sınıflandırmayı etkilememektedir.

MDS-IB ve AML ayrımının yapılmasında, blast oranının belirlenmesindeki bazı zorluklar ve bir standardizasyon olmadığı için birçok risk söz konusudur. Bu sebeple genetik anomalileri tanımlayarak AML türleri için blast eşik değerleri ortadan kaldırılmıştır ve sadece MDS'yi AML'den ayırmak için %20 blast eşik değeri kabul edilmiştir. Ayrıca MDS-IB2, terapötik değerlendirmeler ve klinik araştırma çalışmalarında AML eşdeğeri olarak kabul edilebileceği belirtilmiştir (19).

Biyolojik olarak childhood MDS (cMDS), yetişkinlerde gözlenenden farklıdır ve patogenezinin daha fazla aydınlatılması gerekmektedir. Sınıflandırmada yapılan güncelleme ile cMDS with low blasts terimi refrakter sitopeninin yerini almıştır (Tablo 3.2) (19).

Çocukluk çağı MDS'de tanı konulabilmesi için öncelikle enfeksiyonlar, yetersiz beslenme, metabolik hastalıklar, kemik iliği yetmezliği sendromları ve germline patojenik varyantların sebep olduğu, neoplastik olmayan sitopenilerin dışlanması gerekmektedir.

3.2. Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri

3.2.1. Prognostik Genetik Faktörler

MDS'lerde oldukça fazla genetik anomalinin tanımlanması ile bu anomalilerin prognostik etkileri de açığa kavuşturulmuştur. Prognostik sınıflandırmada bu genetik anomaliler de rol almaktadır.

Tablo 3.1. Myelodisplastik neoplazilerin sınıflandırılması ve tanımlayıcı özellikleri

	Blast	Sitogenetik	Mutasyon
Genetik anomaliler tanımlanan MDS			
Düşük blast oranı ve izole 5q delesyonu olan MDS (MDS-5q)	<%5 KI ve <%2 PK	izole 5q delesyonu, ya da monozomi 7/delesyon 7q hariç 1 diğer anomali	
Düşük blast oranı ve SF3B1 mutant MDS1 (MDS-SF3B1)		5q delesyonu, monozomi 7 ya da kompleks karyotip olmaması	SF3B1
Bilallelik TP53 inaktif MDS (MDS-biTP53)	<%20 KI ve PK	Genellikle kompleks karyotip	2 ya da daha fazla TP53 mutasyonu ya da TP53 kopya sayısı kaybı veya CNLOH'a sebep olan 1 mutasyon
Morfolojik olarak tanımlanan MDS			
Low blasts MDS (MDS-LB)	<%5 KI ve <%2 PK		
Hypocellular MDS ² (MDS-h)			
Increased blasts MDS (MDS-IB)			
MDS-IB1	%5-9 KI ya da %2-4 PK		
MDS-IB2	%10-19 KI ya da %5-19 PK ya da Auer rod		
Fibrosis MDS (MDS-F)	%5-19 KI; %2-19 PK		
¹ : ≥%15 halka sideroblastların saptanması, SF3B1 mutasyonunun yerine geçebilir. Kabul edilebilir ilgili terminoloji: Düşük blast oranı ve halka sideroblastlı MDS. ² : Yaşa göre, ≤%25 kemik iliği selülaritesi KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, CNLOH: Copy neutral loss of heterozygosity, MDS: Myelodisplastik neoplaziler			

Tablo 3.2. Çocukluk çağı myelodisplastik neoplaziler

	Blast
Düşük blast oranı olan çocukluk çağı MDS	<%5 Kİ, <%2 PK
Hiposellüler	
Başka şekilde belirlenmeyen (NOS)	
Yüksek blast oranı olan çocukluk çağı MDS	%5-19 Kİ, %2-19 PK
Kİ: Kemik iliği, PK: Periferik kan, MDS: Myelodisplastik neoplaziler	

International Prognostic Scoring System (IPSS) tedavi edilmemiş, yetişkin hastaların prognozlarını değerlendirmek için önemli bir standarttır. Revised-IPSS sisteminde de (IPSS-R) sitogenetik veriler, blast oranları ve sitopeniler önemlerini korumaktadırlar. Sitogenetik anomaliler IPSS-R'de 5 prognostik grup altında toplanmaktadır; çok iyi, iyi, orta, kötü, çok kötü (Tablo 3.3) (20).

Bunların yanı sıra WHO classification-based Prognostic System'de kullanılmaktadır. Burada da normal karyotip, izole Y kaybı, izole 5q ya da 20q delesyonu iyi, kromozom 7 anomalileri ve 3'ten fazla anomali olarak tanımlanan kompleks karyotip kötü ve diğer sitogenetik anomaliler [t(8;21), inv(16), t(15;17) hariç] orta prognostik faktör olarak sınıflandırılmaktadır (21).

Teknolojinin gelişmesi ile MDS'de birçok moleküler düzeyde anomaliler tanımlanmış olup, bu anomalilerin de prognostik etkileri açığa kavuşmaya başlamıştır. Molecular-International Prognostic Scoring System (IPSS-M) moleküler düzeyde tanımlanan genetik anomalileri göz önünde bulundurarak bir risk sınıflandırması sunmaktadır (<https://mds-risk-model.com/>). Bu sınıflandırmada yer alan mutasyonlar Tablo 3.4'te yer almaktadır (21).

Tablo 3.3. MDS sitogenetik skorlama sistemi

Prognostik alt grup	Sitogenetik anomaliler
Çok iyi	-Y, del(11q)
İyi	Normal, del(5q), del(12p), del(20q), çift del(5q)
Orta	del(7q), +8, +19, i(17q), herhangi 1 ya da 2 bağımsız klon
Kötü	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), -7 ve del(7q), kompleks: 3 anomali
Çok kötü	Kompleks: >3 anomali
Del: Delesyon, -: Monozomi, MDS: Myelodisplastik neoplaziler	

Tablo 3.4. IPSS-M prognostik risk şemasında yer alan gen mutasyonları

Ana etki genleri	Rezidüel genler
<i>TP53 multi</i>	<i>BCOR</i>
<i>MLL PTD</i>	<i>BCORL1</i>
<i>FLT3</i>	<i>CEBPA</i>
<i>SF3B1^{5q}</i>	<i>ETNK1</i>
<i>NPM1</i>	<i>GATA2</i>
<i>RUNX1</i>	<i>GNB1</i>
<i>NRAS</i>	<i>IDH1</i>
<i>ETV6</i>	<i>NF1</i>
<i>IDH2</i>	<i>PHF6PPM1D</i>
<i>CBL</i>	<i>PRPF8</i>
<i>U2AF1</i>	<i>PTPN11</i>
<i>SRSF2</i>	<i>SETBP1</i>
<i>DNMT3A</i>	<i>STAG2</i>
<i>ASXL1</i>	<i>WT1</i>
<i>KRAS</i>	
<i>SF3B1^α</i>	
<i>SF3B1^{13q}</i> : <i>SF3B1</i> mutasyonu + 5q delesyonu ya da bir diğer anomali [-7/del(7q) hariç] <i>SF3B1^α</i> : <i>SF3B1</i> mutasyonu fakat <i>BCOR</i> , <i>BCORL1</i> , <i>RUNX1</i> , <i>NRAS</i> , <i>STAG2</i> , <i>SRSF2</i> mutasyonları veya del(5q) negatif, IPSS-M: Molecular-International Prognostic Scoring System	

MDS'lerde sıklıkla saptanan ancak negatif olma durumlarında MDS tanısını dışlamayan bazı somatik mutasyonların meydana geldiği genler ve prognostik etkileri aşağıda listelenmiştir (bakınız Bölüm 9);

- *TET2* mutasyonları genellikle normal karyotip ile ilişkilidir.
- *DNMT3A* mutasyonları genellikle AML'de gözlenir.
- *ASXL1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *RUNX1*, *STAG*, *NRAS*, *ETV6*, *GATA2*, *BCOR*, *FLT3*, *WT1*, *NPM1* ve *EZH2* mutasyonları bağımsız olarak kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir.
- *SF3B1* mutasyonları genellikle halka sideroblastlar ile ilişkili olup, bağımsız şekilde iyi prognoz ile ilişkilendirilmektedir.
- *TP53* mutasyonları bağımsız olarak kötü prognoz ile ilişkilendirilmekte olup, sıklıkla kompleks karyotip (%50) ve 5q delesyonlarına (%15-20) eşlik etmektedir. Tedavi direncine ve relapsa neden olabilmektedir.

- *IDH1* ve *IDH2* mutasyonları daha sıklıkla AML'de gözlenir. *IDH2* mutasyonları kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir.

3.2.2. Analiz Yöntemleri

- MDS'lerde tekrar eden kromozomal anomalilerin tespit edilebilmesi için tanı anında, tüm kromozomların sayısal ve yapısal olarak değerlendirilmesine imkan sunan konvansiyonel sitogenetik analizlerin yapılması önerilmektedir.

- Konvansiyonel sitogenetiğin başarısız olduğu durumlarda, 5q, 7q, 20q, *TP53* ve 11q delesyonlarının tespit edilebilmesi için floresan in situ hibridizasyon (FISH) testi uygulanabilir.

- Bu testler kemik iliği aspirasyon örneklerinden çalışılmalıdır ve konvansiyonel sitogenetik analizlerin normal olarak raporlanması için en az 20 metafaz plağının değerlendirilmesi gerektiği göz önünde bulundurulmalıdır.

- Konvansiyonel sitogenetik analizler için kemik iliği örnekleri 24 ve 48 saat kültüre edilmelidir. Her yıl bu testler tekrar edilmelidir.

- American Association for Cancer Research'e göre tanı anında sitogenetik çalışmaların yanı sıra somatik varyantların araştırılması için myeloid panelin de çalışılması önerilmektedir.

- *RUNX1*, *GATA2* veya Fankoni anemisi gibi patojenik varyantları taşıyan, risk altındaki hastalar ve aile üyeleri için ise takip olarak altı ayda bir tam kan sayımı önerilir. Yalnızca kan sayımı değerlerinin kötüleşmesi durumunda kemik iliği aspirasyonu, sitogenetik ve myeloid panel önerilmektedir.

- Klonal evölüsyonun takibinin yapılabilmesi için de yıllık somatik, patojenik varyant analizleri de önerilmektedir (bakınız Bölüm 9) (22).

- MDS'lerin risk sınıflandırılmasında da önemli yere sahip *TP53* gen varyantları mutasyon, delesyon ya da loss of heterozygosity (LOH) tipinde gözlenebilmektedir. Biallelik *TP53* anomalileri çoklu mutasyonlar ya da diğer allelin delesyonu sonucu oluşabilmektedir. Bu sebeple *TP53* gen anomalilerinin saptanması için 4-11 eksonlarını kapsayan bir dizileme çalışması yanı sıra FISH ya da array teknolojileri ile kopya sayısı değişikliklerinin analizlerinin yapılması önerilmektedir (15).

3.3. MDS'de Tedavi

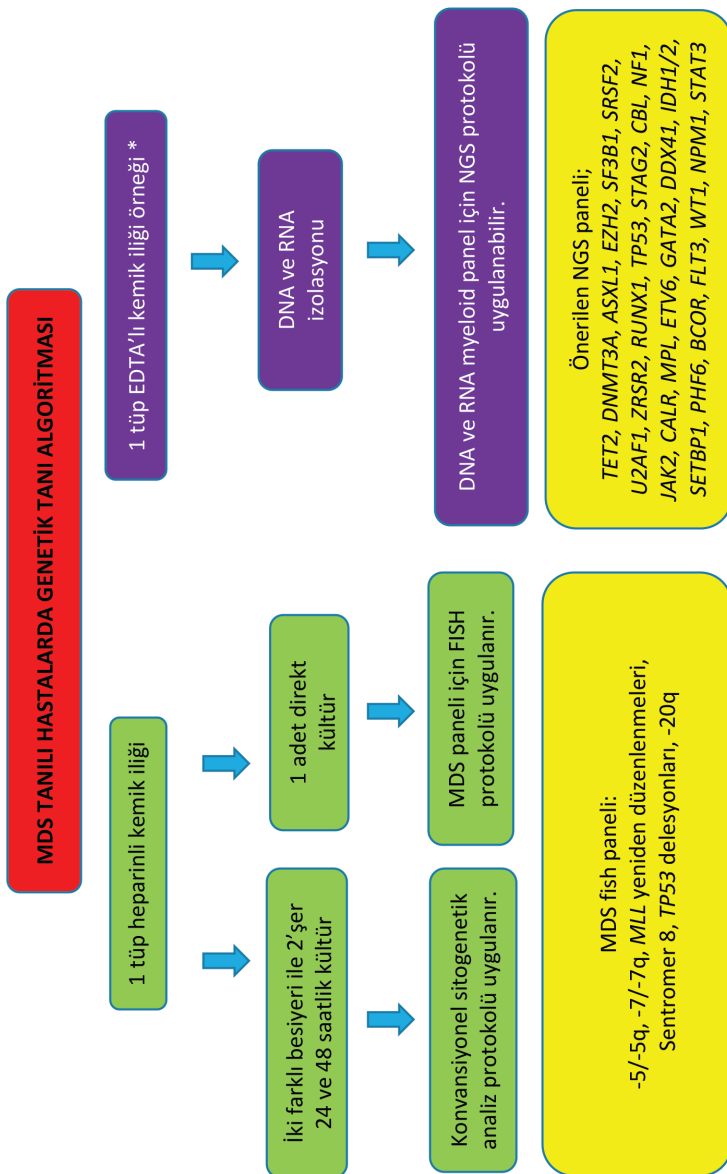
MDS'lerde tedavi yaklaşımlarından önce risk sınıflandırmasının değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu risk değerlendirmelerinde genetik anomalilerin rolü olduğu için, genetik testlerin hızla sonuçlanması gerekmektedir. Risk değerlendirme sonuçlarına göre kılavuzlarda önerilerin tedavi yöntemleri uygulanmaktadır.

Yapılan genetik analizler sonucunda 5q delesyonu saptandığında lenalidomid isimli etken maddeyi içeren ilaçlar tedavide kullanılmaktadır.

Ayrıca tedavi hedefi olarak *BCL2* inhibitörleri ve *IDH1/2* inhibitörlerinin etkileri üzerindeki çalışmalar devam etmektedir.

Özet;

- MDS genetik anomalilere ve morfolojik özelliklere göre olmak üzere ayrı sınıflandırılmaktadır.
- Genetik anomaller tanımlanan MDS düşük blast oranı ve 5q delesyonu olan, düşük blast oranı ve *SF3B1* mutant MDS ve biallelik *TP53* inaktif MDS olmak üzere üçe ayrılır.
- *SF3B1* ve çoklu vuruş olmayan *TP53* mutasyonları MDS-5q sınıflandırmasını etkilemez.
- MDS ve AML ayrımında %20 blast oranı eşik değeri olarak kabul edilmektedir.
- Kromozomal anomaliler MDS risk sınıflandırmasında rol oynamaktadır.
- Birçok gen mutasyonu MDS risk sınıflandırmasında rol oynamaktadır.
- Tanı anında kemik iliği örneklerinden konvansiyonel sitogenetik analizler yapılmalıdır.
- Ayrıca tanı anında myeloid panel ile somatik varyant analizi yapılmalıdır.



Kaynaklar

1. Sekeres MA, Taylor J. Diagnosis and Treatment of Myelodysplastic Syndromes: A Review. *JAMA* 2022;328:872-880.
2. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F, Kantarjian H, Kuendgen A, Levis A, Malcovati L, Cazzola M, Cermak J, Fonatsch C, Le Beau MM, Slovak ML, Krieger O, Luebbert M, Maciejewski J, Magalhaes SM, Miyazaki Y, Pfeilstöcker M, Sekeres M, Sperr WR, Stauder R, Tauro S, Valent P, Vallespi T, van de Loosdrecht AA, Germing U, Haase D. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012;120:2454-2465.
3. DeZern AE, Greenberg PL. Recent Clinical and Molecular Advances for the Classification of Myelodysplastic Neoplasms. *J Natl Compr Canc Netw* 2022;20:1280-1283.
4. Schlegelberger B, Mecucci C, Wlodarski M. Review of guidelines for the identification and clinical care of patients with genetic predisposition for hematological malignancies. *Fam Cancer* 2021;20:295-303.
5. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, Bejar R, Berti E, Busque L, Chan JKC, Chen W, Chen X, Chng WJ, Choi JK, Colmenero I, Coupland SE, Cross NCP, De Jong D, Elghetany MT, Takahashi E, Emile JF, Ferry J, Fogelstrand L, Fontenay M, Germing U, Gujral S, Haferlach T, Harrison C, Hodge JC, Hu S, Jansen JH, Kanagal-Shamanna R, Kantarjian HM, Kratz CP, Li XQ, Lim MS, Loeb K, Loghavi S, Marcogliese A, Meshinchi S, Michaels P, Naresh KN, Natkunam Y, Nejati R, Ott G, Padron E, Patel KP, Patkar N, Picarsic J, Platzbecker U, Roberts I, Schuh A, Sewell W, Siebert R, Tembhare P, Tyner J, Verstovsek S, Wang W, Wood B, Xiao W, Yeung C, Hochhaus A. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022;36:1703-1719.

HEMATOLOJİK
MALİGNİTELERDE GENETİK
ALGORİTMA KILAVUZU

IV. BÖLÜM

MYELODİSPLASTİK/ MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLER

Yazarlar:
Gülçin Günden
Ebru Erzurumluoğlu Gökalp



4. MYELODİSPLASTİK/MYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLER

Myelodisplastik/myeloproliferatif neoplaziler (MDS/MPN) kategorisi MDS ve MPN'nin örtüşen patolojik ve moleküler özellikleri ile tanımlanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO 5. baskı) sınıflandırmasında kronik myelomonositik lösemi (KMML) tipinde önemli güncellemeler olmuştur (15).

Tablo 4.1'de MDS/MPN grubunun sınıflandırması yer almaktadır.

Tablo 4.1. MDS/MPN grubunun sınıflandırması
Kronik myelomonositik lösemi
Nötrofili olan myelodisplastik/myeloproliferatif neoplaziler
<i>SF3B1</i> mutasyonu ve trombositozu olan myelodisplastik/myeloproliferatif neoplaziler
Myelodisplastik/myeloproliferatif neoplaziler, diğer gruplarda tanımlanmayan

4.1. Kronik Myelomonositik Lösemi

KMML MDS/MPN'nin en yaygın tipi olup, periferik kanda monositoz ve epigenetik regülasyon, splisozom, sinyal iletimleri gibi önemli mekanizmalarda rol alan genlerdeki somatik mutasyonlar ile karakterizedir.

4.1.1. Kronik Myelomonositik Lösemide Tanı

KMML'nin tanı kriterleri Tablo 4.2'de yer almaktadır (15).

Ancak tanıda dikkat edilmesi gereken bazı önemli noktalar vardır;

1. MPN tanısına sahip bir hastada tanı anında veya daha sonra monositoz gözlelenebilir ve bu durum KMML'yi taklit edebilir. Bu durumda olgularda MPN tanısı olması, KMML tanısını dışlar. Kemik iliğinde MPN bulguları olması ya da MPN ilişkili mutasyonların (*JAK2*, *CALR*, *MPL*) yüksek oranda saptanması tanının MPN olduğunu destekler niteliktedir.

2. Tirozin kinaz füzyonu saptanan myeloid/lenfoid neoplaziler için kriterler, eozinofili olgularında özellikle dışlanmalıdır.

3. Morfolojik displazi, kemik iliğinde hematopoietik bir kökenden gelen hücrelerin $\geq 10\%$ unda bulunmalıdır.

4. Periferik kan monosit alt kümelerinin anormal bölünmesi, bilinen aktif otoimmün hastalıklar ve/veya sistemik enflamatuvar sendromlar yokluğunda artan klasik monositlerin ($>94\%$) saptanmasına dayalıdır.

Tablo 4.2. Kronik myelomonositik lösemi tanı kriterleri**Ön koşul kriterleri**

1. Kalıcı mutlak ($\geq 0,5 \times 10^9/L$) ve bağıl (≥ 10) periferik kan monositozu
2. Blastlar, periferik kan ve kemik iliğindeki hücrelerin < 20 'sini oluşturmaması
3. Kronik myeloid lösemi veya diğer myeloproliferatif neoplazilerin tanı kriterlerini karşılamaması
4. Tirozin kinaz füzyonları ile myeloid/lenfoid neoplazilerin tanı kriterlerini karşılamaması

Destekleyici kriterler

1. ≥ 1 myeloid soy içeren displazi
2. Klonal sitogenetik veya moleküler anomali saptanması
3. Periferik kan monosit alt kümelerinin anormal bölünmesi

Tanı için gereklilikler

Ön koşul kriterlerinin mevcut olması

Monositoz $\geq 1 \times 10^9/L$ ise: bir veya daha fazla destekleyici kriter karşılanmalı

Monositoz $\geq 0,5$ ve $< 1 \times 10^9/L$ ise: destekleyici kriterler 1 ve 2 karşılanmalı

Alt tip kriterleri

Myelodisplastik KMML (MD-KMML): WBC $< 13 \times 10^9/L$

Myeloproliferatif KMML (MP-KMML): WBC $\geq 13 \times 10^9/L$

Alt tip kriterleri (blastların ve promonositlerin yüzdesine göre)

KMML-1: Periferik kanda < 5 ve kemik iliğinde < 10

KMML-2: Periferik kanda $5-19$ ve kemik iliğinde $10-19$

KMML: Kronik myelomonositik lösemi, MD: Myelodisplastik, MP: Myeloproliferatif

Ancak hala KMML'nin yeni tanı kriterlerine uymayan, açıklanamayan klonal monositozu bireyleri sınıflandırmak için en uygun yaklaşımın belirlenebilmesi adına ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

4.1.2. Diğer MDS/MPN Grupları

Atipik kronik myeloid lösemi terimi yerine yeni güncelleme ile nötrofili olan MDS/MPN kullanılmaktadır. Böylelikle KML ile karışıklık önlenmiş olmaktadır.

Halka sideroblastları ve trombositozu olan MDS/MPN, *SF3B1* mutant olduğunda *SF3B1* mutasyonu olan MDS/MPN olarak yeniden tanımlanmıştır. *SF3B1* wild tip olduğunda ise halka sideroblastları ve trombositozu olan MDS/MPN terimi hala kullanılabilir (15).

4.2. MDS/MPN'de Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri

KMML'de en sık gözlenen mutasyonlar *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *NRAS* ve *CBL* gen mutasyonlarıdır. *Janus kinaz-2 (JAK2)* mutasyonları da gözlenebilmekte olup, *JAK2* inhibitörleri ile tedavi uygulanabilir (2).

MDS/MPN'lerde en sık gözlenen mutasyonlar ve uygulanabilecek tedavi seçenekleri Tablo 4.3'te yer almaktadır (2).

Tablo 4.3. MDS/MPN'de saptanan mutasyonlar ve tedavi seçenekleri

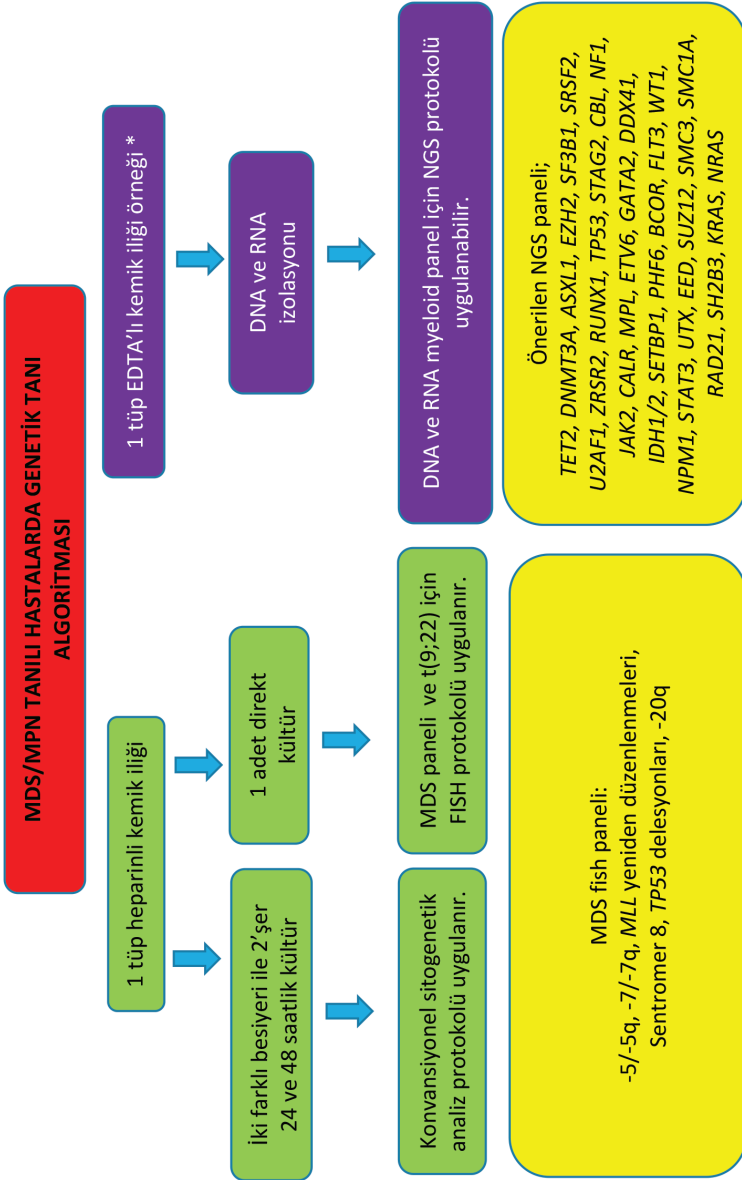
Alt tipi	En sık gözlenen mutasyonlar	Tedavi
Kronik myelomonositik lösemi-1	<i>TET2</i> , <i>SRSF2</i> , <i>ASXL1</i> , <i>RUNX1</i> , <i>NRAS</i> , <i>CBL</i>	HMA
Kronik myelomonositik lösemi-1	<i>TET2</i> , <i>SRSF2</i> , <i>ASXL1</i> , <i>RUNX1</i> , <i>NRAS</i> , <i>CBL</i>	HMA + <i>JAK2</i> inhibitörü ve/veya allojenik KIT
Trombositoz ve <i>SF3B1</i> mutasyonu olan MDS/MPN	<i>SF3B1</i> , <i>JAK2</i> , <i>MPL</i> , <i>CALR</i>	HMA ve/veya lenalidomide veya Luspatercept
Nötrofili olan MDS/MPN	<i>SETBP1</i> , <i>ETNK1</i> , <i>BCR::ABL1</i> negatif	HMA ve/veya <i>JAK2</i> inhibitörleri ve/veya allojenik KIT
MDS/MPN diğer gruplarda tanımlanmayan	<i>TET2</i> , <i>NRAS</i> , <i>RUNX1</i> , <i>CBL</i> , <i>SETBP1</i> , <i>ASXL1</i>	HMA ve/veya allojenik KIT
HMA: Hipometilleyici ajanlar, KIT: Kemik iliği transplantasyonu, <i>JAK2</i> : <i>Janus kinaz-2</i> , MDS: Myeloproliferatif neoplazma, MPN: Myeloproliferatif neoplaziler		

Gen mutasyonlarının yanı sıra KMML'de *ETV6::PDGFR β* füzyon geninin oluşmasına sebep olan t(5;12) saptanan olgulara ise tirozin kinaz inhibitör tedavisi verilebilir. Ayrıca MDS/MPN grubunda sık gözlenen kromozomal anomaliler trizomi 8 (+8), Y kromozom kaybı, kromozom 7 aberasyonları (monozomi 7 ve del7q), trizomi 21 (+21) ve kompleks karyotip olarak bilinmektedir. İlgili tanıda izole del(5q) (<%1) ve monozomal karyotipler (~%10) nadir olarak görülmektedir (3).

Kromozom anomalilerinin analizlerine imkan veren konvansiyonel sitogenetik çalışmalar için heparinli tüpte, kemik iliği örnekleri ile çalışılmalı ve örnekler 24-48 saat kültür edilmelidir. Gen mutasyonları için ise reverse transcription-polymerase chain reaction ya da yeni nesil sekanslama temelli gen panelleri önerilmektedir. Moleküler çalışmalar için ise örneklerin ethylenediamine tetraacetic acid'li (EDTA) tüpte laboratuvara ulaştırılması gerekmektedir. Gen panellerinde bulunması gereken genler Tablo 4.4'te yer almaktadır (4).

Tablo 4.4. KMML'de analiz edilmesi önerilen gen mutasyonları

Hücresel görevleri	İlişkili genler ve görülme sıklıkları
Epigenetik regülatör genlerinin mutasyonları	<i>TET2</i> (~%60), <i>DNMT3A</i> , <i>IDH1</i> ve <i>IDH2</i>
Kromatin regülasyonu ve histon modifikasyon mutasyonları	<i>ASXL1</i> (~%40), <i>EZH2</i> , <i>UTX</i> , <i>EED</i> ve <i>SUZ12</i>
Splicing mekanizma mutasyonlar	<i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> (~%50), <i>U2AF1</i> ve <i>ZRSR2</i>
Kohesin kompleks mutasyonları	<i>STAG2</i> , <i>BCOR</i> , <i>SMC3</i> , <i>SMC1A</i> ve <i>RAD21</i>
DNA hasar yanıt genlerinin mutasyonları	<i>TP53</i> (~1%) ve <i>PHF6</i>
Sinyal transdüksiyon ve hücresele/reseptör tirozin kinaz yollarında mutasyonlar	<i>JAK2</i> , <i>SH2B3</i> (<i>LNK</i>), <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> (<i>RAS</i> ~%30), <i>CBL</i> (~%10-15), <i>FLT3</i> ve <i>NPM1</i>
Diğerleri	<i>RUNX1</i> (<i>TF</i>) ve <i>SETBP1</i> (~%15)
KMML: Kronik myelomonositik lösemi	



Kaynaklar

1. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, Bejar R, Berti E, Busque L, Chan JKC, Chen W, Chen X, Chng WJ, Choi JK, Colmenero I, Coupland SE, Cross NCP, De Jong D, Elghetany MT, Takahashi E, Emile JF, Ferry J, Fogelstrand L, Fontenay M, Germing U, Gujral S, Haferlach T, Harrison C, Hodge JC, Hu S, Jansen JH, Kanagal-Shamanna R, Kantarjian HM, Kratz CP, Li XQ, Lim MS, Loeb K, Loghavi S, Marcogliese A, Meshinchi S, Michaels P, Naresh KN, Natkunam Y, Nejati R, Ott G, Padron E, Patel KP, Patkar N, Picarsic J, Platzbecker U, Roberts I, Schuh A, Sewell W, Siebert R, Tembhare P, Tyner J, Verstovsek S, Wang W, Wood B, Xiao W, Yeung C, Hochhaus A. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022;36:1703-1719.
2. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Myelodysplastic syndromes, version 1. 2023.
3. Rack KA, van den Berg E, Haferlach C, Beverloo HB, Costa D, Espinet B, Foot N, Jeffries S, Martin K, O'Connor S, Schoumans J, Talley P, Telford N, Stioui S, Zemanova Z, Hastings RJ. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia* 2019;33:1851-1867.
4. Patnaik MM, Tefferi A. Cytogenetic and molecular abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood Cancer J* 2016;6:e393.

HEMATOLOJİK
MALİGNİTELERDE GENETİK
ALGORİTMA KILAVUZU

V.
BÖLÜM

AKUT MYELOİD LÖSEMİ

Yazarlar:

Sevgi Işık

Beyhan Durak Aras



5. AKUT MYELOİD LÖSEMİ

Akut myeloid lösemi (AML), myeloid, megakaryositik, eritroid ve monositik hücreleri oluşturacak olan öncül hücrelerde meydana gelen hematolojik bir malignitedir. Olgunlaşmamış hücrelerin birikimi kemik iliğinde başlamakta ve periferik kanda hızla sürmektedir. Bazen lenf düğümleri, dalak, karaciğer, testisler ve merkezi sinir sistemi gibi diğer bölgelere yayılmaktadır (23). AML insidansı yaşla birlikte artmakta olup, AML tanısı alan hastaların %60'ı tanı anında 60 yaş üzerindedir. Üç ve beş yıllık sağkalım oranının ileri yaş hastalarında %5-8 arasında olduğu bildirilmektedir (24).

5.1. Tanı ve Sınıflandırma

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) AML sınıflandırılmasını yakın zamanda güncellemiştir. Bu güncellemeye ihtiyaç duyulmasına sebep olan nedenler; tekrarlayan genetik anomalilerin tanı, prognoz ve AML'ye yakınlık açısından klinik önemlerinin büyük ölçüde ortaya koyulmuş olması, minimal rezidüel hastalığın (MRD) takibinin yapılmasındaki teknolojik gelişmeler, bunların sonuçlarının terapötik yanıt ve hastalık risk değerlendirilmesindeki etkileri, yeni terapötik hedeflerin geliştirilmesidir.

WHO'nun AML sınıflandırmasında yaptığı en son güncellemesine (WHO 5. baskı) göre en önemli yenilikler;

- AML hücre farklılaşmasına göre tanımlanan AML'den, genetik anomaliler ile tanımlanan AML'yi ayırması (Tablo 5.1),
- Daha önce AML NOS (AML Not Otherwise Specified) olarak tanımlanan ve karışıklığa sebep olan sınıflandırmayı kaldırması,
- *BCR::ABL1* füzyonu pozitif AML ve *CEBPA* mutasyonu pozitif AML haricinde, genetik anomaliler ile tanımlanan AML türleri için %20 blast oranı gerekliliğinin ortadan kaldırılmasıdır (15).

Aşağıdaki tabloda (Tablo 5.1) yer alan, tanısal öneme sahip genetik anomalilerden birkaçı hakkında önemli bilgiler:

- *KMT2A*, *MECOM*, *NUP98* gen yeniden düzenlenmelerinin kriptik olabileceği konvansiyonel sitogenetik analizler esnasında göz önünde bulundurulmalıdır. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi yardımcı test olarak kullanılabilir.

- *MLL*'nin 80'den fazla partnerinin tanımlanmış olması sebebiyle, daha önce t(9;11) olarak tanımlanan sınıfın *MLL* gen yeniden düzenlenmeleri olarak sınıflandırılmasına ihtiyaç duyulmuştur. Zorunlu tutulmamakla birlikte, prognostik bilgi sağlayacağı ve hastalık takibini etkileyeceği için *MLL* geninin partnerin tanımlanması önerilmektedir.

Tablo 5.1. Akut myeloid lösemi WHO sınıflandırması

Akut myeloid lösemi	
Genetik anomaliler ile tanımlanan AML	Farklılaşma ile tanımlanan AML
<i>PML::RARA</i> füzyonu pozitif akut promyelositik lösemi	Minimal farklılaşma gösteren akut myeloid lösemi
<i>RUNX1::RUNX1T1</i> füzyonu pozitif akut myeloid lösemi	Maturasyon göstermeyen akut myeloid lösemi
<i>CBFB::MYH11</i> füzyonu pozitif akut myeloid lösemi	Maturasyon gösteren akut myeloid lösemi
<i>DEK::NUP214</i> füzyonu pozitif akut myeloid lösemi	Akut bazofilik lösemi
<i>RBM15::MRTFA</i> füzyonu pozitif akut myeloid lösemi	Akut myelomonositik lösemi
<i>BCR::ABL1</i> füzyonu pozitif akut myeloid lösemi	Akut monositik lösemi
<i>KMT2A</i> yeniden düzenlenmesi pozitif akut myeloid lösemi	Akut eritroid lösemi
<i>MECOM</i> yeniden düzenlenmesi pozitif akut myeloid lösemi	Akut megakaryoblastik lösemi
<i>NUP98</i> yeniden düzenlenmesi pozitif akut myeloid lösemi	
<i>NPM1</i> mutasyonu pozitif akut myeloid lösemi	
<i>CEBPA</i> mutasyonu pozitif akut myeloid lösemi	
Myelodisplazi-ilişkili akut myeloid lösemi (AML-MR)	
Diğer genetik anomalilerin tespit edildiği akut myeloid lösemi	
WHO: Dünya Sağlık Örgütü, AML: Akut myeloid lösemi	

- Mutasyonlar açısından sınıflandırılan AML'de ise *NPM1* ve *CEBPA* mutasyonları göz önünde bulundurulmalıdır.

- *NPM1* mutasyonu pozitif AML'de blast oranından bağımsız olarak tanı konabilir.

- *CEBPA* mutasyonu pozitif AML'de ise tek ya da çift allel mutasyon pozitif olabilir. Genin basic leucine zipper (bZIP) monoallelik mutasyonları pediatrik ve 70 yaşına kadar olan yetişkinlerde iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir.

- *RUNX1* mutasyonlarının ise ayrı bir grup olarak sınıflandırılması için yeterli özgüllükte veri bulunmamaktadır.

Yapılan bir diğer güncelleme ise daha önce myelodisplazi ilişkili değişikliklere sahip AML olarak tanımlanan AML alt grubunun, myelodisplazi-ilişkili AML (AML-MR) olarak yeniden tanımlanmasıdır. Bu AML tipi için karakteristik özellikler;

- Myeloid immünofenotipte ≥ 20 blast oranı,
- MDS ilişkili sitogenetik ve moleküler anomaliler bulunması,
- MDS, MDS/MPN öyküsü olması veya *de novo* gelişmesidir.

Yeni WHO güncellemesine göre artık sadece morfolojinin tek başına tanıda kullanılması kabul edilmemektedir. Sitogenetik kriterler güncellenmiş ve 8 genlik (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR*, *STAG2*) bir gen paneli tanımlanmıştır. Tanımlanan mutasyonların yaklaşık %95'ten fazlası MDS, MDS/MPN sonrası gelişen AML'de tespit edilmektedir. AML-MR tanısının konulması için diagnostik öneme sahip genetik anomaliler Tablo 5.2'de yer almaktadır.

Tablo 5.2. AML-MR'de diagnostik genetik anomaliler

Sitogenetik anomaliler

Kompleks karyotip (≥ 3 anomali)
 5q delesyonu ya da 5q delesyonu ile sonuçlanan dengesiz translokasyonlar 11q delesyonu
 12p delesyonu ya da 12p delesyonu ile sonuçlanan dengesiz translokasyonlar
 Monozomi 13 ya da 13q delesyonu
 17p delesyonu ya da 17p delesyonu ile sonuçlanan dengesiz translokasyonlar
 İzokromozom 17q
 idic(X)(q13)

Somatik gen mutasyonları

ASXL1, *BCOR*, *EZH2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1*, *ZRSR2*

Diğer genetik değişikliklere sahip AML'de ise şu an nadir görülen genetik füzyonlar yer almaktadır.

5.1.1. Farklılaşma ile Tanımlanan AML

Bu AML sınıfı genetik anomali tanımlanmayan grupları içermektedir. Tanı konulması için gerekli olan kriterler Tablo 5.3'te yer almaktadır.

5.2. Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri

5.2.1. Prognostik Genetik Faktörler

AML'nin genetik açıdan oldukça heterojen olması, tekrarlayan genetik anomalilerin risk grubu açısından sınıflandırılması ve sürekli güncellenmesi ihtiyacını beraberinde getirmektedir.

- European LeukemiaNet'in (ELN) son güncellemesinde yapılan en önemli değişikliklerden birisi *FLT3*:- allel yükünün artık sınıflandırmada göz önünde bulundurulmamasıdır. *FLT3*- ITD mutasyonları kötü prognostik etkisi olan bir genetik anomalinin eşlik etmediği durumlarda orta prognostik risk sınıfında yer almaktadır.

- Yapılan diğer önemli değişikliklerden birisi de myelodisplazi-ilişkili AML gen mutasyonlarının kötü prognostik risk grubunda sınıflandırılmasıdır. Artık sadece *ASXL1* ve/veya *RUNX1* gen mutasyonları değil *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* ve *ZRSR2* genlerinin en az birinde patojenik varyant saptanması myelodisplazi ile ilişkilendirilmesi için yeterli kabul edilmektedir.

- *NPM1* gen mutasyonu “iyi prognostik risk” grubunda yer almaktadır. Fakat *NPM1* gen mutasyonuna kötü prognostik etkisi olduğu bilinen sitogenetik bir anomalinin eşlik etmesi durumunda, *NPM1* gen mutasyonu “kötü prognostik risk” sınıfına dahil edilmelidir.

- *CEBPA* geninin bZIP bölgesini etkileyen in-frame mutasyonlar, biallelik ya da monoallelik olmasına bakılmaksızın iyi prognostik risk grubunda sınıflandırılır.

- Daha önce sadece t(3;3) veya inv(3) ile ilişkilendirilen MECOM yeniden düzenlenmesi artık t(3q26.2;v) olarak tanımlanmakta ve kötü risk grubunda yer almaktadır. Ayrıca t(8;16)(p11.2;p13.3) (*KAT6A::CREBBP* gen füzyonu) da kötü prognostik risk grubunda yer almaktadır.

- Hiperdiploid karyotipler ise artık kompleks karyotip ve kötü prognostik risk grubunda yer almamaktadır (25).

ELN'nin AML'de saptanan genetik anomalileri prognostik riskleri açısından güncel sınıflandırması Tablo 5.4'te yer almaktadır.

Tablo 5.3. Farklılaşma ile tanımlanan AML'de diagnostik kriterler

Tip	Tanı Kriteri*
Minimal farklılaşma olan AML	MPO ve SBB için sitokimyasal olarak blastların negatif olması (<%3)
	CD13, CD33, CD117 gibi iki ya da daha fazla myeloid ilişkili antijenlerin ekspresyonu
Olgunlaşma olmayan AML	MPO ve SBB için immünofenotip ya da sitokimyasal olarak ≥ 3 blast oranı, ya da sitokimyasal olarak NSE negatif olması
	Olgun granülosit hücreleri çekirdekli kemik iliği hücrelerinin <%10'nu oluşturmali
	MPO, CD13, CD33, CD117 gibi en az iki myeloid antijenin ekspresyonunun olması
	MPO (immünofenotipleme ya da sitokimyasal olarak) ve SBB (sitokimyasal olarak) ≥ 3 blast pozitif olması
Olgunlaşma olan AML	Çekirdekli kemik iliği hücrelerinin ≥ 10 'unun olgun granülosit hücreler içermesi
	Kemik iliği hücrelerinin <%20'sinin monosit hücre içermesi
Akut basofilik lösemi	MPO, CD13, CD33, CD117 gibi en az iki myeloid antijenin ekspresyonunun olması
	Toluidine blue boyamada metachromasia'lı blast, olgunlaşmış/olgunlaşmamış basofiller
	Blastların sitokimyasal olarak MPO, ABB, NSE negatif olması
	Güçlü CD117 ekspresyonunun olmaması (mast hücreli lösemiye dışlamak için)
Akut myelomonositik lösemi	Monositlerin ve prekürsörlerinin ≥ 20 olması
	Olgun granülosit hücrelerinin ≥ 20 olması
	MPO (immünofenotipleme ya da immünohistokimyasal olarak) ≥ 3 blast pozitif olması

Tablo 5.3. Devami

Tip	Tanı kriteri*
Akut monositik lösemi	Monositlerin ve/veya prekürsörlerinin ≥ 80 olması
	Olgun granülosit hücrelerin < 20 olması
	En az iki monosit markerlarının (CD11c, CD14, CD36, CD64) pozitif olması ya da sitokimyasal olarak NSE pozitif olması
Akut eritroid lösemi	Olgunlaşmamış eritroid hücrelerin (proeritroblast) ≥ 30 olması
	Kemik iliğinin eritrosit baskın olması (genellikle ≥ 80)
Akut megakaryoblastik lösemi	Blastların en az bir ya da daha fazla trombosit glikoproteinlerini (CD41, CD61, CD42b) ekspres etmesi
*Ortak tanı kriterleri	
Kemik iliği ya da kanda ≥ 20 blast bulunması (akut eritrosit lösemi hariç)	
Tanımlanmış genetik anomalilerin tespit edilmemiş olması	
Miks fenotipli AML olmaması (minimal farklılaşma gösteren AML için)	
Sitotoksik terapi sonrası myeloid neoplazi kriterlerinin karşılanmaması	
Myeloproliferatif neoplazi öyküsünün olmaması	
MPO: Myeloperoksidaz, NSE: Non-spesifik esterasez, SBB: Sudan Black B, AML: Akut myeloid lösemi	

Tablo 5.4'te yer alan genetik anomaliler ile ilgili bazı ayrıntılara yer vermemiz gerekirse;

- İyi prognostik risk grubunda bulunan t(8;21)'e *KIT* ya da *FLT3* mutasyonlarının eşlik etmesi bu anomalinin risk kategorisini değiştirmemektedir.
- Kötü risk grubunda yer alan *KMT2A* yeniden düzenlenmeleri *KMT2A* parsiyel tandem duplikasyonlarını içermemektedir.
- Kompleks karyotip ise diğer risk grubunda bulunmayan, birbirinden bağımsız en az üç anomalinin varlığı olarak kabul edilmekte ve hiperdiploid karyotipler bunun dışında kalmaktadır.

Tablo 5.4. Tanıda saptanan genetik anomalilerin ELN'ye göre risk sınıflandırması

Risk kategorisi	Genetik anomali
İyi	t(8;21)(q22;q22.1)/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i>
	inv(16)(p13.1q22) veya t(16;16)(p13.1;q22)/ <i>CBFB::MYH11</i>
	Mutant <i>NPM1</i> (<i>FLT3</i> -ITD yokluğunda)
	bZIP in-frame mutant <i>CEBPA</i>
Orta	Mutant <i>NPM1</i> ile <i>FLT3</i> -ITD
	Wild-type <i>NPM1</i> ile <i>FLT3</i> -ITD (kötü riskli genetik anomali yokluğunda)
	t(9;11)(p21.3;q23.3)/ <i>MLL3::KMT2A</i>
	İyi ya da kötü olarak risk sınıflandırması yapılmamış sitogenetik ve/veya moleküler anomaliler
Kötü	t(6;9)(p23.3;q34.1)/ <i>DEK::NUP214</i>
	t(v;11q23.3)/ <i>KMT2A</i> -yeniden düzenlenmeleri
	t(9;22)(q34.1;q11.2)/ <i>BCR::ABL1</i>
	t(8;16)(p11.2;p13.3)/ <i>KAT6A::CREBBP</i>
	inv(3)(q21.3q26.2) veya t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2, MECOM(EVI1)</i>
	t(3q26.2;v)/ <i>MECOM(EVI1)</i> -yeniden düzenlenmeleri
	-5 veya del(5q); -7; -17/abn(17p)
	Kompleks karyotip, monozomal karyotip
	Mutant <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1</i> ve/veya <i>ZRSR2</i>
	Mutant <i>TP53</i>

ELN: European LeukemiaNet

- Monozomal karyotip, X ve Y kromozomları hariç, iki veya daha fazla farklı monozomi varlığı ya da en az bir yapısal anomali ile tek bir otozomal monozomi (core-binding AML hariç) varlığı olarak tanımlanmaktadır.

- *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* ve/veya *ZRSR2* mutasyonları iyi prognostik bir belirteç ile birlikte tespit edilmesi durumunda kötü prognostik marker olarak düşünülmemektedir.

- *TP53* mutasyonlarında ise mono/biallelik olmasına bakılmaksızın, en az %10'luk allel frekansı ile bir varyasyon saptanması durumunda bu mutasyonlar kompleks karyotip ya da monozomal karyotip ile ilişkilendirilmektedir.

- *IDH1/IDH2* ya da *DNMT3A* gibi mutasyonlar için ise ayrı ELN prognostik grup oluşturulması için yeterli veri bulunmamakla birlikte, *IDH* genlerinin tedavi hedef olmasının prognozu etkileyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

- Ayrıca bu risk sınıflandırılmasının yoğun tedavi gören hasta verilerine dayanarak geliştirildiği ve daha az yoğun tedavi verilen hastalar için değişiklikler gerekebileceği de göz önünde bulundurulmalıdır (25).

- Akut promyelositik lösemi (APL) ise t(15;17)(q24;q21) translokasyonu ile karakterize olup, hastaların %95'inde bu translokasyon gözlenmektedir.

- APL hastaları beyaz kan hücrelerinin sayısına göre düşük, orta ve yüksek risk sınıfına ayrılır.

- *FLT3*, *WT1*, *NRAS*, *KRAS*, *ARID* ve *PML* genlerinde mutasyonlar *PML::RARA* füzyonuna eşlik edebilir. *Fms like tyrosine kinase 3* en sık mutasyon gözlenen genidir.

- *PML* ve *RARA* genlerindeki mutasyonlar daha çok relapsta gözlenir (5).

5.2.2. Analiz Yöntemleri

AML sınıflandırmasında oldukça önemi olan genetik anomalilerin büyük kısmının tanımlanmasında kullanılan ve tüm kromozomların sayısal ve yapısal olarak değerlendirilmesine imkan sunan konvansiyonel sitogenetik, AML değerlendirilmesinde yapılması zorunlu olan bir testtir. Ancak konvansiyonel sitogenetiğin başarısız olduğu durumlarda, t(8;21), inv(16), *MLL*, *MECOM* gen yeniden düzenlenmeleri veya 5q, 7q, 17p gibi delesyonların saptanmasında FISH testi uygulanabilir (25).

Moleküler yöntemlerle ise tanısıl, prognostik ve tedavi hedefi olduğu bilinen tüm anomalilerin analizlerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu testler ticari olarak oluşturulmuş gen panelleri veya aynı anda mutasyonları ve yeniden düzenlenmeleri saptayabilecek platformlar tarafından gerçekleştirilebilir.

ELN'nin tanıda ve risk sınıflandırmasında yapılması gereken çalışma önerileri Tablo 5.5'te yer almaktadır.

5.3. AML'de MRD

AML'de MRD değerlendirilmesi;

- Derin bir remisyon durumu oluşturmak için kantatif bir metot sağlamak,
- Remisyon sonrası relaps riskinin belirlenmesi ve erken müdahaleyi sağlamak için yaklaşan nüksü belirlemek,
- Akselere ilaç testi ve onayı için bir son nokta belirlemek için kullanılmasını sağlamak amacıyla yapılmaktadır.

Şu anda MRD analizi için en kapsamlı iki metot kullanılmaktadır; multiparameter flow cytometry-MRD ve quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (moleküler MRD). Yeni nesil sekanslama (NGS) ve dijital PCR yöntemleri de MRD analizleri için kullanılmak için geliştirilmektedirler (Tablo 5.6) (25).

MRD analizlerinde bireysel mutasyonlar için bir eşik değeri yoktur. Klonal hematopoez ve germline mutasyonları haricinde varyant allel frekansı $\geq 0,1$ olarak kabul edilmektedir. Ayrıca *DNMT3A*, *TET2* ve *AXSL1* gibi malign öncesi klonal hematopoez ile uyumlu yaygın gen mutasyonları hariç tutulmalıdır. Çünkü hangi mutasyonların gerçekten rezidüel AML'nin göstergesi olduğunu ve klonal hematopoez olmadığını belirlemek için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

5.4. AML'de Tedavi

AML'de tekrarlayan genetik anomalilerin tanımlanması ile tedavi hedefleri artmakta ve son yıllarda hem başlangıç hem de nüks refrakter AML hastaları için yeni ilaçların the U.S. Food and Drug Administration (FDA) onayı almış olması bu hasta grubunun tedavisi için oldukça umut vericidir. Tedavi seçeneklerinin artması ile birlikte klinisyenlerin süreci yönetmeleri de zorlaşmaktadır. İndüksiyon tedavisi seçiminde yaklaşım oldukça önemlidir. Tedavi öncesi sitogenetik ve mutasyon profili burada önemli bir rol oynamakta ve terapi sonucu tahminini güçlendirmektedir.

AML'de saptanan genetik anomalileri hedefleyen tedavi seçeneklerini özetlemek gerekirse;

- *FLT3* mutant, yoğun kemoterapiye uygun AML'de, başlangıç tedavisine *FLT3* inhibitörleri tedaviye eklenir.
- Yoğun kemoterapiye yanıt vermeyen ya da relaps olan *FLT3* mutant hastalarda hastalık progresyonu boyunca bir diğer *FLT3* inhibitör tedavisi verilir. Bu inhibitör

Tablo 5.5. AML'de tanı anında ELN tarafından önerilen testler

Tanısal testler		Ek testler
Tam kan sayımı ve differansiyel sayım (en az ikibin hücre sayılmalı)		- Komple fizik muayene - Performans durumu (ECOG/WHO skoru) - Geriatrik değerlendirme (isteğe bağlı) - Biyokimya ve pıhtılaşma testleri - Hepatit A, B, C, HIV1 testi, CMV, EBV, HSV, VZV - Serum gebelik testi - Allojenik HCT için uygunluk değerlendirmesi - Göğüs röntgeni, 12-lead elektrokardiyogram, ekokardiyogram ya da MUGA (endikasyon varsa) - Bilgisayarlı tomografi (endikasyon varsa) - Lomber ponksiyon (endikasyon varsa) - Oosit ve sperm kriyoprezervasyon bilgisi - Biyobanka
Kemik iliği aspirasyonu		
Kemik iliği trefin biyopsisi		
Flow sitometri ile immünofenotipleme		
Genetik analizler	Sonuçlanması için önerilen süre	
Sitogenetik ^{1,2} (kemik iliği tercihen)	5-7 gün	
Tanı koymak ve tedavi hedefi belirlemek için gen mutasyonlarının taranması (kemik iliği ya da periferik kan)		
<i>FLT3, IDH1, IDH2</i>	3-5 gün	
<i>NPM1</i>	3-5 gün	
<i>CEBPA, DDX41, TP53; ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ZRSR2</i>	1. kür döngüsü	
Gen yeniden düzenlenmelerinin taranması		- Göğüs röntgeni, 12-lead elektrokardiyogram, ekokardiyogram ya da MUGA (endikasyon varsa) - Bilgisayarlı tomografi (endikasyon varsa) - Lomber ponksiyon (endikasyon varsa) - Oosit ve sperm kriyoprezervasyon bilgisi - Biyobanka
<i>PML::RARA, CBFB::MYH11, RUNX1::RUNX1T1, KMT2A</i> yeniden düzenlenmeleri, <i>BCR::ABL1</i> , diğer füzyon genleri (eğer mümkünse)		
Tanıda önerilen gen mutasyonları		
<i>ANKRD26, BCORL1, BRAF, CBL, CSF3R, DNMT3A, ETV6, GATA2, JAK2, KIT, KRAS, NRAS, NF1, PHF6, PPM1D, PTPN11, RAD21, SETBP1, TET2, WT1</i>		
Medikal öykü		
Demografik ve medikal öykü		
Detaylı aile öyküsü		
Hasta kanama öyküsü		
Komorbidite analizi		

¹AML'de sitogenetik analizler için 24-48 saat kültür örnekleri tercih edilir. t(15;17) analizi için 48 saat kültür önerilmektedir. ²Konvansiyonel sitogenetik sonuçlarının normal olarak değerlendirilebilmesi için en az 20 metafaz plağının değerlendirilmesi gerekmektedir. WHO: Dünya Sağlık Örgütü, CMV: Sitomegalovirüs, EBV: Epstein-Barr virüsü, HSV: Herpes simpleks virüsü

Tablo 5.6. MRD analiz yöntemleri						
	Metot	Hedef	Sensitivite	AML %	Süre	Problemler
Uygulanmakta	MFC	Lösemi ilişkili fenotip ya da normalden farklılaşma	10^{-3} - 10^{-4}	85-90	2	Daha az sensitivite, daha subjektif analiz
Uygulanmakta	RT-qPCR	Sağlam veriler: <i>NPM1</i> , <i>CBFB::MYH11</i> , <i>RUNX1::RUNX1T1</i> Daha düşük doğrulukta veriler: <i>KMT2A::MLLT3</i> , <i>DEK::NUP214</i> , <i>BCR::ABL1</i> , <i>WT1</i>	10^{-4} - 10^{-5}	40-50	3-5	Sınırlı uygulanabilirlik
Araştırılmakta	NGS	Herhangi mutasyon	10^{-2} - 10^{-4}	-100	5-10	Daha az sensitivite, pahalı, teknik olarak zor
Araştırılmakta	dPCR	Spesifik hedef mutasyonlar	10^{-3} - 10^{-4}	-70	3-5	Her mutasyon için gerekli spesifik test, sınırlı sensitivite
MFC: Multiparameter flow cytometry, RT-qPCR: Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, dPCR: Dijital PCR, NGS: Yeni nesil sekanslama						

yoğun kemoterapiye uygun olmayan, *FLT3* mutant AML'de kurtarma tedavisi olarak da verilebilir.

- Yoğun kemoterapiye uygun olmayan, *IDH1* veya *IDH2* mutant AML'de kurtarma tedavisi olarak *IDH* inhibitör tedavisi verilebilir.

- Yoğun kemoterapiye uygun olmayan, *IDH1* mutant AML'de, başlangıç tedavisinde hastanın durumuna göre *IDH1* inhibitörü monoterapi olarak da verilebilir.

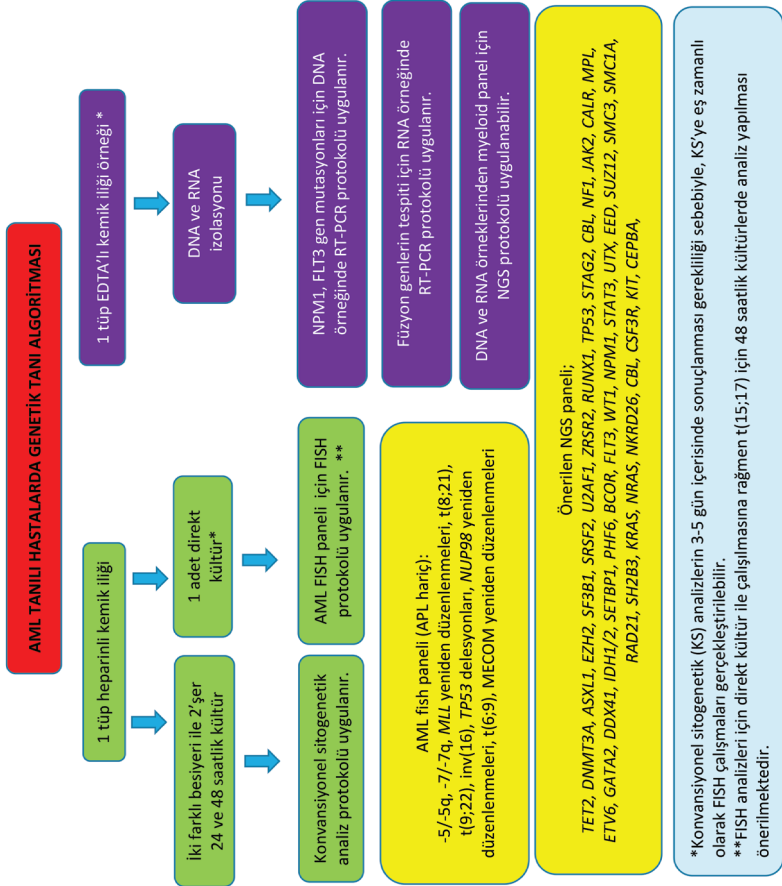
AML'de saptanan genetik anomalilerin tedavi yanıtları üzerinde birçok çalışma devam etmekte olup, yakın tarihte, AML'de tedavi önerilerinin hızla gelişeceği ön görülmektedir. Ancak tedavi seçeneklerinin belirlenebilmesi için genetik analizlerin 3-5 gün içerisinde sonuçlandırılması gerektiği muhakkak göz önünde bulundurulmalıdır.

Özet;

- Yeni tanı AML'de genetik anomaliler ile tanımlanan AML'de sınıflandırmada rol oynayan *PML::RARA*, *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFBMTH11*, *DEK::NUP214*, *RBM15::TRTFA* füzyonları, *BCR::ABL*, *KMT2A*, *MECOM*, *NUP98* yeniden düzenlenmeleri ve *NPM1* ve *CEBPA* mutasyonlarının analizleri gerçekleştirilmelidir.
- *KMT2A*, *MECOM*, *NUP98* yeniden düzenlenmeleri kriptik olabileceği için FISH yöntemi ile analiz edilmesi gerekmektedir.
- AML-MR tanısı için artık sadece morfoloji yeterli değildir.
- AML-MR tanısı için kompleks karyotip, 5q, 11q, 12p, 17p, 13q delesyonları, izokromozom 17 ya da idic(X) kromozom anomalilerinin tespiti edilmeli gerekmektedir.
- AML-MR tanısı için ayrıca moleküler olarak *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* ve *ZRSR2* gen mutasyonları saptanmalıdır.
- *FLT3-ITD* mutasyonları kötü prognostik etkisi olduğu bilinen bir anomalinin eşlik etmediği durumlarda orta prognostik risk grubunda yer almaktadır.
- *NPM1* gen mutasyonları kötü prognostik etkisi olduğu bilinen bir anomalinin eşlik etmesi durumunda kötü risk grubunda yer almaktadır.
- t(8;21)'e *KIT* ya da *FLT3* mutasyonlarının eşlik etmesi bu anomalinin risk grubunu değiştirmemektedir.
- Kötü risk grubunda yer alan *KMT2A* yeniden düzenlenmeleri parsiyel tandem duplikasyonları içermemektedir.
- *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* ve/veya *ZRSF2* mutasyonları iyi prognostik bir belirteç ile birlikte tespit edildiğinde kötü risk grubunda kabul edilmemektedirler.
- AML sınıflandırmasında rol oynayan genetik anomalilerin yanı sıra prognostik etkisi bilinen, Tablo 5.4'te yer alan genetik anomalilere yönelik de genetik testlerin yapılması gerekmektedir.

Özet;

- *TP53* mutasyonları %10'luk allel frekansı ile saptandığında kompleks karyotip veya monozomal karyotip ile ilişkilendirilmektedir.
- AML'de tanı ve risk sınıflandırılması için yapılması gereken testler konusunda ELN'nin önerileri Tablo 5.5'te yer almaktadır.
- Konvansiyonel sitogenetik analizlerinde kemik iliği örnekleri 24-48 saat kültüre edilmelidir.
- t(15;17) analizleri için 48 saatlik kültürlerde sitogenetik analizlerin yapılması tercih edilmelidir.
- Konvansiyonel sitogenetik testlerin normal olarak değerlendirilebilmesi için en az 20 metafaz plağının analizlerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.
- Füzyon genlerin tespit edilmesi için RT-PCR yöntemi kullanılabilir.
- Diagnostik ve prognostik önemi olan gen mutasyonları için NGS temelli yöntemler kullanılabilir.
- Tüm genetik testlerin en geç 5 gün içinde sonuçlanması gerekmektedir.



Kaynaklar

1. Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Rev* 2017;31:63-76.
2. Alibhai SM, Leach M, Minden MD, Brandwein J. Outcomes and quality of care in acute myeloid leukemia over 40 years. *Cancer* 2009;115:2903-2911.
3. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, Bejar R, Berti E, Busque L, Chan JKC, Chen W, Chen X, Chng WJ, Choi JK, Colmenero I, Coupland SE, Cross NCP, De Jong D, Elghetany MT, Takahashi E, Emile JF, Ferry J, Fogelstrand L, Fontenay M, Germing U, Gujral S, Haferlach T, Harrison C, Hodge JC, Hu S, Jansen JH, Kanagal-Shamanna R, Kantarjian HM, Kratz CP, Li XQ, Lim MS, Loeb K, Loghavi S, Marcogliese A, Meshinchi S, Michaels P, Naresh KN, Natkunam Y, Nejati R, Ott G, Padron E, Patel KP, Patkar N, Picarsic J, Platzbecker U, Roberts I, Schuh A, Sewell W, Siebert R, Tembhare P, Tyner J, Verstovsek S, Wang W, Wood B, Xiao W, Yeung C, Hochhaus A. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022;36:1703-1719.
4. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Godley LA, Hasserjian RP, Larson RA, Levine RL, Miyazaki Y, Niederwieser D, Ossenkoppele G, Röllig C, Sierra J, Stein EM, Tallman MS, Tien HF, Wang J, Wierzbowska A, Löwenberg B. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* 2022;140:1345-1377.
5. Jimenez JJ, Chale RS, Abad AC, Schally AV. Acute promyelocytic leukemia (APL): a review of the literature. *Oncotarget* 2020;11:992-1003.

HEMATOLOJİK
MALİGNİTELERDE GENETİK
ALGORİTMA KILAVUZU

VI.
BÖLÜM

KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ

Yazarlar:

Sevgi Işık

Beyhan Durak Aras



6. KRONİK LENFOSİTİK LÖSEMİ

Kronik lenfositik lösemi (KLL) batı ülkelerinde en sık gözlenen lösemi tipi olup, yıllık insidansı 4,2/100.000'dir. Ortalama tanı yaşı 72'dir. Toplumdaki demografik değişiklikler nedeniyle önümüzdeki on yıllarda KLL'nin prevalansı ve mortalitesinin daha da artması beklenmektedir. Ayrıca, daha sık kan testi yapılması nedeniyle erken evre KLL ve minimal semptomları olan genç hastaların oranının da gittikçe arttığı belirtilmektedir (26).

6.1. Tanı

Periferik kanda $5 \times 10^9/L$ monoklonal B lenfositlerin olması ve B-hücrelerin klonitesinin flow sitometri ile doğrulanması gerekmektedir.

- Periferik kanda flow sitometri ile hücre yüzey markerları kullanılarak yapılan immünofenotiplleme tanı için yeterli olup, genellikle kemik iliği biyopsisi gerekmemektedir.

6.2. Evreleme

- Hastaların takibini yapmak için rutinde kullanılan iki evreleme sistemi vardır: Rai ve Binet.
- Rai evreleme sistemi hastaları üç risk grubunda toplar: Düşük risk (Rai evre 0), orta risk (Rai evre I-II) ve yüksek risk (Rai evre III-IV) (27).
- Binet evreleme sistemi de hastaları grup A, grup B ve grup C olmak üzere üç prognostik gruba ayırır (28).

Her iki evreleme sistemi de muayene bulgularına (lenf nodu tutulumu, dalak ve/veya karaciğer büyümesi) ve kan parametlerine (anemi ya da trombositemi) dayanmaktadır. KLL tanısında prognostik önemi bilinen genetik belirteçlerin tanımlanması sonucu yeni bir sınıflandırmaya ihtiyaç duyulmuştur. *IGHV* mutasyon durumu, serum $\beta 2$ mikroglobulin, 17. kromozom kısa kol delesyonları [del(17p)] ya da *TP53* aberasyonları gibi prognostik faktörlerden hastalık prognozunun belirlenmesinde faydalanılmaktadır. Prognozu öngörmek için yapılan sınıflandırmalardan birisi olan CLL international prognosis index (CLL-IPI) klinik evre, yaş, *IGHV* mutasyon durumu, serum $\beta 2$ mikroglobulin ve del(17p) ve/veya *TP53* mutasyon durumunu değerlendiren bir skorlama yapmaktadır (29).

6.3. Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri

KLL'de myeloid neoplazilerin aksine genellikle sayısal kromozom anomalileri saptanmaktadır. Ancak son zamanlarda tekrar eden gen mutasyonları da tespit

edilmiş olup, prognostik önemleri tanımlanmaya başlamıştır. Bu bölümde KLL’de rutin uygulamalarda bakılması önerilen genetik anomalilerin önemleri ve analiz etme yöntemleri hakkında bilgi verilecektir.

National Comprehensive Cancer Network tarafından rutinde değerlendirilmesi gereken prognostik faktörler *IGHV* gen mutasyonları, delesyon 13q, trizomi 12, delesyon 11q, delesyon 17p ve *TP53* mutasyonlarıdır (Şekil 6.1) (30).

TP53 ve IGHV gen mutasyonları			
	İyi prognoz	Kötü prognoz	
TP53	Wild tip	Mutant	
IGHV	>%2 mutasyon	<%2 mutasyon	
FISH testleri			Kompleks karyotip
İyi	Orta prognoz	Kötü	Kötü prognoz
İzole	Normal	Del(17p)	≥3 bağımsız kromozomal anomali
Del(13q)	Trizomi 12	Del(11q)	(1’den fazla hücrede)

Şekil 6.1. KLL’de prognostik genetik faktörler

KLL: Kronik lenfositik lösemi

6.3.1. Prognostik Genetik Faktörler

6.3.1.1. Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region (*IGHV*) Mutasyonları

IGHV mutasyon durumu yaşam süresini öngörmek için oldukça önemli ve bağımsız bir prognostik faktör olarak kabul edilmektedir. Germline gen dizisi ile %98 ya da daha fazla benzerlik göstermesi durumunda *IGHV* geni mutasyonsuz olarak kabul edilmektedir. *IGHV* geninin unmutated olması (UM-*IGHV*), mutated-*IGHV*’ye (M-*IGHV*) göre daha kısa yaşam süresi ile ilişkilendirilmekte ve kötü prognostik biyobelirteç olarak kabul edilmektedir. Ayrıca *VH3-21* gen dizisi (subset #2) de kısa tedaviye başlama süresi ve yaşam süresi ile ilişkilidir (31).

Günümüzde ayrıca *IGHV* mutasyon durumu kemoimmünoterapiye yanıt için önemli bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir. Mutant *IGHV* hastaları kemoimmünoterapiden daha fazla faydalanabilmektedirler (32).

IGHV Mutasyon Analizleri İçin Laboratuvar Uygulama Önerileri

- Analizler öncelikle periferik kan olmak üzere kemik iliği örneklerinden de elde edilen lenfosit hücrelerinde gerçekleştirilebilir.
- Örneklerin ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) veya trisodium citrate/pyridoxal 5'-phosphate/Tris tüpleri içerisinde olması gerekmektedir.
- Periferik kan örneklerinden en az 3 mL, kemik iliği örneklerinden ise en az 1 mL olması *IGHV* testleri için yeterlidir (33).
- Hem complementary DNA (cDNA) hem de genomic DNA (gDNA) örnekleri ile çalışılabilir.
- Örneklerin monoklonalite göstermesi gerekmektedir.
- Konvansiyonel dizileme yapılmalıdır.
- Elde edilen dizinin germline *IGHV* dizisi ile homolojisi tespit edilmelidir.
- Farklılık >%2 ise mutant olarak kabul edilmelidir.

Klinikte *IGHV* mutasyonlarının önemleri daha iyi anlaşıldıkça, European Research Initiative on CLL (ERIC) *IGHV* analizleri için bir konsensus geliştirilmiştir. Bu analizler için hem cDNA hem de gDNA kullanılabilmekte olup, cDNA fonksiyonel yeniden düzenlenmenin tanımlanmasında gDNA'dan avantajlıdır. Çünkü gDNA analiz edilirken ikinci allelde oluşan ve saptanabilen, transkripsiyonu gerçekleşmeyen ya da fonksiyonel ürün vermeyen *IGH* geninin yeniden düzenlenmeleri nedeniyle iki yeniden düzenlenme oluştuğunda ekstra bir dizileme reaksiyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak gDNA'nın kullanılması durumunda da ters transkripsiyon basamağına ihtiyaç duyulmaz. Saklanan örnekler için ise gDNA kullanılması önerilmektedir. Analizler için ERIC farklı primer grupları oluşturmuştur (34). Bu primer gruplarından lider primerlerin *IGHV* geninin tüm dizinin amplifikasyonuna imkan vermesi sebebiyle lider primerlerin kullanılması önerilmektedir. Amplifikasyon için multipleks polymerase chain reaction (PCR) yöntemi önerilmekte olup, birden fazla yeniden düzenlenme tespit edildiğinde her bir 5' primer için ayrı ayrı PCR reaksiyonu yapılmalıdır. GeneScan ya da PAGE elektroforez kullanılarak *IGH* yeniden düzenlenmeleri gösterilmelidir. Agaroz jel elektroforez ise gDNA'nın klonalitesinin yanlış yorumlanmasına sebep olabileceği için kesinlikle önerilmemektedir. Forward ve reverse primerler ile konvansiyonel dizileme işlemi gerçekleştirilir. Nükleotid dizisinin analizi IMGT/V-QUEST [the international ImMunoGeneTics information system (www.imgt.org)] üzerinden yapılır ve germline *IGHV* dizisi ile gösterdiği homoloji analiz edilir. IMGT/V-QUEST NCBI tarafından onaylanan diziye referans almaktadır (35).

6.3.1.2. Kromozomal Anomaliler

Daha önce tedavi almamış KLL hastalarının %80'inde floresan in situ hibridizasyon (FISH) ile kromozomal anomali saptanmaktadır. Tanı anında en sık gözlenen anomaliler 13. kromozom uzun kol delesyonu [del(13q), %55], 11. kromozom uzun kol delesyonu [del(11q), %18], trizomi 12 (%16) ve 17. kromozom kısa kol delesyonlarıdır [del(17p), %7]. Delesyon 13q izole olarak saptandığında iyi prognoz ile ilişkilendirilmekte olup, ortalama yaşam süresi 133 aydır. Daha sonra 79 ay ortalama yaşam süresi ile ilişkili olan del(11q) genellikle lenfadenopati ve hastalık progresyonu ile ilişkilendirilmektedir. Tedavi alan hastalarda daha sık gözlenen, *TP53* genini de içeren kromozom 17p delesyonları (diğer allelinde de *TP53* mutasyonu gözlenir) kısa ortalama yaşam süresi (32 ay) ve kemoterapiye kötü yanıt ile ilişkilendirilmektedir (36). Konvansiyonel sitogenetik ile saptanan kompleks karyotip (bir hücrede ≥ 3 bağımsız hastalık ilişkili kromozomal anomali) del(17p) ya da *TP53* mutasyonlarından daha kötü bir prognoz için belirteç olarak kabul edilebilir. Yüksek kompleks karyotip (≥ 5 bağımsız kromozomal anomali) klinik evre, *IGHV* mutasyonu, *TP53* aberasyonlarından bağımsız olarak kötü prognostik bir faktör olarak kabul edilmektedir. Oysaki düşük kompleks karyotip (3 bağımsız kromozomal anomali) ve orta kompleks karyotip (4 bağımsız kromozomal anomali) sadece *TP53* aberasyonları ile birlikte gözleniyor ise kötü prognostik faktör olarak kabul edilmektedir.

6.3.1.2.1. Kromozomal Anomaliler İçin Laboratuvar Uygulama Önerileri

İnterfaz FISH (iFISH) konvansiyonel sitogenetiğe göre daha düşük orandaki anomalileri saptayabildiği için KLL hastalarında konvansiyonel sitogenetik çalışma yapılması zorunlu değildir. Kültür için;

- Periferik kan örnekleri kemik iliğinden daha başarılıdır.
- KLL hücreleri *in vitro* olarak düşük bir proliferasyon hızı gösterdiği için biri 24 saat olmak üzere en az iki kültür yapılmalıdır.
- Oligonükleotid DSP30 ve interlökin-2 ile stimule edilmiş üç günlük kültür yapılması gerekmektedir.
- KLL FISH paneli [del(13q), del(17p), tirozmi 12, del(11q)] uygulanmalıdır. Ayrıca European Cytogeneticists Association 6q21 veya 6q23 bölgeleri için de FISH çalışmaları önermektedir.
- Mantle cell lenfoma ile ayırıcı tanıda FISH oldukça yardımcı bir yöntemdir. Atipik hücre morfolojisi olan veya yüzey marker skoru 3/5 veya daha düşük olgularda muhakkak t(11;14) veya *IGH* break apart prob ile FISH çalışılması gerekmektedir.

6.3.1.3. TP53 Gen Mutasyonları

TP53 aberasyonları kemoterapi direnci ile ilişkili kötü prognostik marker olarak kabul edilmektedir. Diğer sitogenetik anomalilere göre del(17p) daha kısa yaşam süresi ile ilişkili olup, TP53'ün diğer allelinin genellikle (%90) mutant olduğu bilinmektedir. Ancak tedavi almamış KLL hastalarının %5'inde del(17p) gözlenmeksizin TP53 mutasyonları saptanmaktadır ve prognostik etkileri del(17p) ile benzerdir.

6.3.1.3.1. TP53 Mutasyon Analizleri için Laboratuvar Uygulama Önerileri

İlk tedaviye başlamadan ve sonraki her tedavi kürünün başlangıcında TP53 mutasyonları analiz edilmelidir.

- İlk tercih edilen materyal periferik kan olmalıdır. Kansere hücre fraksiyonuna göre kemik iliği ya da lenf nodu biyopsileri alternatif olabilir.
- Periferik kan ya da kemik iliği EDTA ya da heparin gibi antikoagülan içeren tüplerde toplanmalı ve lenfosit fraksiyonunu artırmak için santrifüjleme ile mononükleer hücre ayrımı yapılmalıdır.
- Solid doku materyali için taze/dondurulmuş örnekler tercih edilmelidir. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) örneklerle ise alternatif bir numuneye ulaşılmadığı durumlarda başvurulmalıdır.
- Minimum 4-10 eksonları dizilenmelidir. Mutasyon görülme sıklığı daha düşük olsa da 2., 3. ve 11. eksonların da dizilenmesi önerilmektedir.
- ERIC TP53 mutasyonları için Sanger dizileme sonuçlarının analizleri için GLASS isimli, web tabanlı bir araç geliştirmiştir ve ücretsiz kullanım olanağı sunmaktadır (<http://www.ericll.org/guidance-toolstp53/>).
- Tespit edilen varyantların hem the IARC TP53 database (<http://p53.iarc.fr/TP53GeneVariations.aspx>) hem de the TP53 website (UMD database; <http://p53.fr/>) veritabanlarında kontrol edilmesi önerilmektedir.

FFPE materyali yüksek oranda bozulmuş DNA örneği içerdiğinden dizileme için daha kısa ampikonların kullanımını gerektirir. Sabitleme esnasında çapraz bağlanmaların oluşması sebebiyle bozulmamış DNA miktarı azalır. Ayrıca DNA kimyasal olarak modifikasyona uğrayabilir. Bu sebeple FFPE örneklerinde tespit edilen bir varyant analizinde oldukça dikkatli olunmalı ve PCR ile confirmasyonu yapılmalıdır.

Eğer örneklerde %60-70'den daha az bir lenfosit içeriği söz konusu ise Sanger dizileme ile yanlış negatif sonuç verilebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu durumun önüne geçmek için CD19+ hücrelerin seçimi yapılmalıdır. Bir başka

seçenek ise çok daha yüksek hassasiyete sahip, düşük varyant allel frekansı sahip mutasyonların tespit edilmesini sağlayan yeni nesil sekanslama (NGS) yöntemi kullanılmalıdır. Ancak mutasyon analizlerinde NGS bazı teknik sınırlamalara sahiptir. Minör klonlardaki mutasyonların klinik önemleri tartışma konusudur. Sanger dizileme ile saptanamayan mutasyonların varlığına dayalı olarak terapötik kararlar vermek için kesin veriler henüz bulunmamaktadır.

TP53 mutasyonlarının analizleri için ERIC TP53 Network'u oluşturmuş olup, örnek seçiminden verilerin analizlerinde faydalanılabilecek veritabanlarına kadar ayrıntılı bilgiler <http://www.ericll.org/> adresinde bulunmaktadır (37).

6.3.1.4. Diğer Gen Mutasyonları

KLL'lerde en sık gözlenen, prognostik önemleri ortaya koyulmuş, tekrar eden diğer gen mutasyonları ise *NOTCH1*, *SF3B1* ve *BIRC3* mutasyonlarıdır. Bu gen mutasyonları yeni tanı KLL'lerin %4-15'inde gözlenirken, fludarabine dirençli KLL hastalarında bu oran %15-25'e kadar çıkmaktadır. Sitogenetik anomaliler ile bu gen mutasyonlarının birlikte değerlendirilmesi sonucunda prognostik etkileri açısından 4 grup oluşturulmuştur; yüksek risk (*TP53* ve/veya *BIRC3* anomalileri), orta risk [*NOTCH1* ve/veya *SF3B1* mutasyonları ve/veya del(11q)], düşük risk (trizomi 12 ve tüm genlerin wild tip olması) ve çok düşük risk (izole delesyon 13q). Bu 4 grubun 10 yıllık yaşam oranları sırasıyla; %29, %37, %57, %69'dur (30). *NOTCH1*, *SF3B1* ve *BIRC3* mutasyonları henüz zorunlu olmayan, ancak bazı merkezlerde analizleri yapılmakta olan genetik anomalilerdir.

Tüm bu gen mutasyonlarının yanı sıra, prognostik önemi ortaya koyulmaya başlanan başka gen mutasyonları da tanımlanmıştır. İleride kılavuzlarda yer alma potansiyeli olan gen mutasyonları Tablo 6.1'de yer almaktadır.

Özetle KLL hastalarında prognozu ön görmek ve optimum tedavi seçenekleri için FISH ile del(17p), del(11q), del(13q) trizomi 12 değerlendirilmeli, *IGHV* ve *TP53* gen mutasyonlarının analizleri yapılmalıdır.

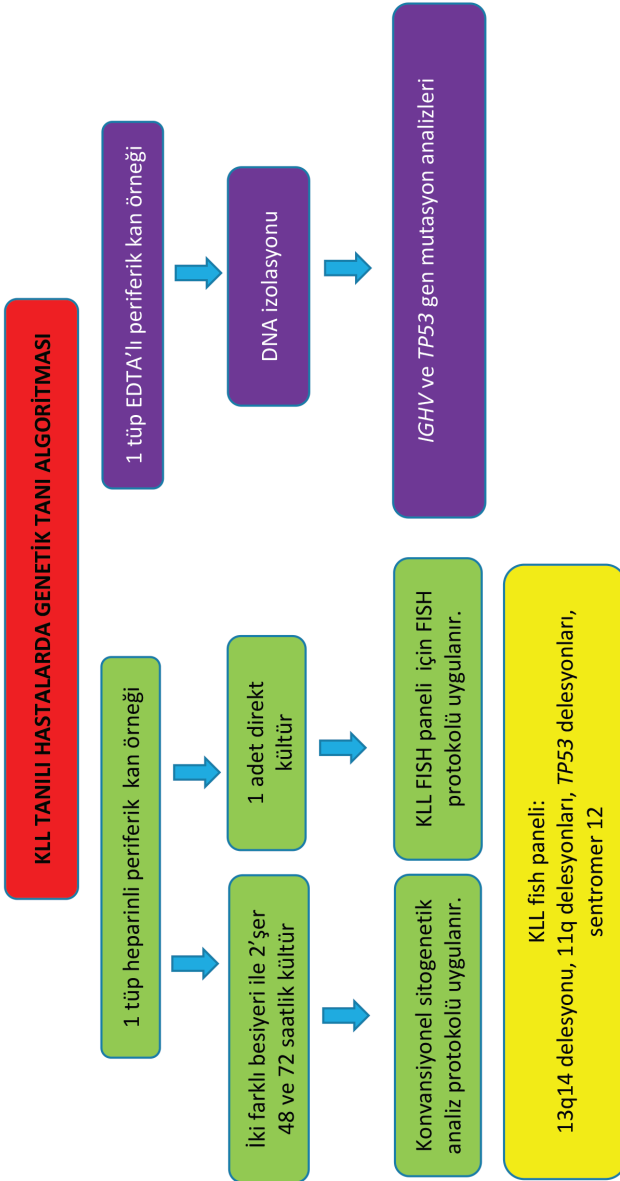
Tablo 6.1. KLL'de driver mutasyonlar

	Gen	Sıklık (%)	Prognostik önemi
Notch sinyal yolağı	<i>NOTCH1</i>	~22	Kısa OS, PFS, TTT, kemoimmüno refrakterliği
	<i>NOTCH1 3'UTR</i>	2-4	Kısa OS ve PFS, TTT, kemoimmüno refrakterliği
	<i>FBXW7</i>	~6	Bilinmiyor
RNA ve ribozomal süreç yolları	<i>SF3B1</i>	13	Kısa TTT ve PFS
	<i>XPO1</i>	7,5	Kısa PFS
	<i>RPS15</i>	~4,3	Kısa PFS
	<i>DDX3X</i>	~5	Bilinmiyor
	<i>MED12</i>	~5,2	Bilinmiyor
DNA hasarı ve hücre döngüsü kontrolü	<i>TP53</i>	~10,6	Kısa OS, kemoimmüno refrakterliği
	<i>ATM</i>	~11	Kısa TTT
	<i>POT1</i>	~5-8	Kısa OS
Kromatin modifikasyonu	<i>CHD2</i>	~5,3	Bilinmiyor
	<i>SETD2</i>	3-4	Kısa PFS ve OS
	<i>IKZF3</i>	2	Kısa TTT ve OS
Enflamatuvar yolak	<i>BIRC3</i>	4	Kısa OS
	<i>MYD88</i>	3	Bilinmiyor
MAPK-ERK yolağı	<i>BRAF</i>	~4	Kısa OS
	<i>KRAS</i>	~6,2	Kısa TTT
	<i>NRAS</i>	~2,4	Kısa TTT, kemoimmüno refrakterliği
MYC ilişkili yolak	<i>MGA</i>	<5	RS için artmış risk, kemoimmüno refrakterliği
B-hücre sinyal yolağı	<i>ERG2</i>	<1	Kısa OS
	<i>BCOR</i>	2-3	Bilinmiyor
	<i>PAX5</i>	23	Bilinmiyor

KLL: Kronik lenfositik lösemi, OS: Overall survival, PFS: Progresyonsuz yaşam süresi, TTT: Time to treatment, Rs: Richter sendromu

Özet;

- Hasta takibi için iki evreleme sistemi kullanılmaktadır; Rai ve Binet.
- Prognostik önemi olan genetik anomaliler başında *IGHV* mutasyonları, *TP53* mutasyonları, trizomi 12, del(17p), del(11q) ve del(13q) gelmektedir.
- *IGHV* mutasyonları dizileme yöntemleri ile germline gen dizisi ile %98 benzerlik eşik değeri oranına göre değerlendirilir. Eğer %2'den daha fazla farklılık saptanır ise *IGHV* mutant olarak kabul edilir.
- *TP53* mutasyonları için min. ekson 4-10 dizilenmelidir.
- FISH testi ile del(13q), del(11q), del(17p) ve trizomi 12 anomalilerine yönelik analiz uygulanır.
- Genetik analizler için periferik kan örneği kullanılır.
- *NOTCH1*, *SF3B1* ve *BIRC3* mutasyonları henüz zorunlu olmayan, bazı merkezlerde analizleri yapılmakta olan, kötü prognostik belirteç olarak kabul edilen genetik anomalilerdir.



Kaynaklar

1. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol* 2019;94:1266-1287.
2. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46:219-234.
3. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbès S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198-206.
4. International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2016;17:779-790.
5. Wierda WG, Brown J, Abramson JS, Awan F, Bilgrami SF, Bociek G, Brander D, Chanan-Khan AA, Coutre SE, Davis RS, Eradat H, Fletcher CD, Gaballa S, Ghobadi A, Hamid MS, Hernandez-Ilizaliturri F, Hill B, Kaesberg P, Kamdar M, Kaplan LD, Khan N, Kipps TJ, Ma S, Mato A, Mosse C, Schuster S, Siddiqi T, Stephens DM, Ujjani C, Wagner-Johnston N, Woyach JA, Ye JC, Dwyer MA, Sundar H. NCCN Guidelines® Insights: Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma, Version 3.2022. *J Natl Compr Canc Netw* 2022;20:622-634.
6. Damle RN, Wasi T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840-1847.
7. Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM, Wierda WG, Stingo F, Plunkett W, Smith SC, Kantarjian HM, Freireich EJ, Keating MJ. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2016;127:303-309.
8. Crombie J, Davids MS. IGHV mutational status testing in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2017;92:1393-1397.
9. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stilgenbauer S, Stevenson F, Davi F, Rosenquist R; European Research Initiative on CLL. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007;21:1-3.
10. Rosenquist R, Ghia P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Agathangelidis A, Baliakas P, Darzentas N, Giudicielli V, Lefranc MP, Langerak AW, Belessi C, Davi F, Stamatopoulos K. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations. *Leukemia* 2017;31:1477-1481.
11. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910-1916.

12. Malcikova J, Tausch E, Rossi D, Sutton LA, Soussi T, Zenz T, Kater AP, Niemann CU, Gonzalez D, Davi F, Gonzalez Diaz M, Moreno C, Gaidano G, Stamatopoulos K, Rosenquist R, Stilgenbauer S, Ghia P, Pospisilova S; European Research Initiative on Chronic Lymphocytic Leukemia (ERIC) — TP53 network. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia-update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia* 2018;32:1070-1080.

HEMATOLOJİK
MALİGNİTELERDE GENETİK
ALGORİTMA KILAVUZU

VII. BÖLÜM

AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ

Yazarlar:

Gülçin Günden
Beyhan Durak Aras



7. AKUT LENFOBlastİK LÖSEMİ

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) kemik iliği (Ki), kan ve ekstramedüller bölgelerde lenfoid projenitör hücrelerin proliferasyonu ve malign transformasyonu ile karakterize lösemi tipidir. İlgili tanının %80'inin çocuklarda meydana gelmesi nedeniyle, çocukluk çağı lösemisi olarak da bilinmektedir. Erişkin hastalarda ise görülme sıklığının ve tedaviye yanıt oranının düşük olduğu bildirilmektedir. Bu yüzden ALL, erişkin hastalarda “yıkıcı” hastalık olarak tanımlanmaktadır (38).

7.1. Tanı ve Sınıflandırma

Dünya Sağlık Örgütü'nün son yaptığı güncellemede (WHO 5. baskı) B-hücreli lenfoid proliferasyon ve lenfomaların sınıflandırmasında önemli değişiklikler yer almaktadır. Bu grup içerisinde yer alan B-hücreli ALL sınıflandırması Tablo 7.1'de yer almaktadır (39).

Sınıflandırmada yapılan değişiklikler, farklı tekniklerinde uygulanmasına izin vermek amacıyla daha çok terminolojide yapılan değişiklikleri içerir ve sitogenetik anomalilerden çok moleküler mekanizmalara odaklanılmaktadır. Kullanılan metotlardaki ilerlemeler aracılığıyla sınıflandırmaya yeni bir sınıf eklenmiştir; *ETV6::RUNX1*-like B-ALL (39).

Ayrıca gen ekspresyonu ve dizileme çalışmaları, farklı klinik özellikler sağlayan yeni genetik anomalilerin tanımlanmasına yol açmıştır. Mevcut sınıflandırmada diğer genetik anomaliler B-ALL sınıfına dahil edilmektedirler. Bu anomaliler arasında *DUX4*, *MEF2D*, *ZNF384* ve *NUTM1* yeniden düzenlenmeleri, *IGH::MYC* füzyonu, *PAX5* alt ve *PAX5* p.80R yer almaktadır. İlginç şekilde *ZNF384* ve *DUX4* yeniden düzenlenmeleri saptanan veya *PAX5* p.80R pozitif B-ALL olgularında, tanıda ya da tedaviyi takiben monositik farklılaşma gösterebilir. Bu da minimal rezidüel hastalık (MRD) değerlendirilmesinde önemli bir etkiye sahiptir (39).

7.2. B-ALL'de Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri

7.2.1. Prognostik Genetik Faktörler

ALL gelişmesinde etkili olan genetik mekanizmalar, hücre büyüme ve farklılaşmasını regüle eden genler ile ilişkilendirilmektedir. ALL'de, genlerin normal fonksiyonlarını kaybetmesine sebep olan genomik değişimler meydana gelmektedir. Bu değişimlerin, hastalık tanısı, sınıflandırması ve tedavinin belirlenmesinde yardımcı olduğu bilinmektedir.

B-ALL'de sitogenetik ve moleküler prognostik risk sınıflandırması Tablo 7.2'de yer almaktadır.

Tablo 7.1. B-hücreli lenfoid proliferasyonların sınıflandırması

Prekürsör B-hücre neoplazileri	
B-hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma (B-ALL)	
WHO sınıflandırması (5. baskı)	WHO sınıflandırması (4. baskı)
B-lenfoblastik lösemi/lenfoma, NOS	(Aynı)
Yüksek hiperdiploidi saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	Hiperdiploidi olan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
Hipodiploidi saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	(Aynı)
iAMP21 saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	(Aynı)
<i>BCR::ABL1</i> füzyonu saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
<i>BCR::ABL1</i> -like bulguları saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	B-lenfoblastik lösemi/lenfoma, <i>BCR-ABL1</i> -like
<i>KMT2A</i> yeniden düzenlenmeleri saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> -yeniden düzenlenmeleri saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
<i>ETV6::RUNX1</i> füzyonu saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	t(12;21)(p13.2;q22.1); <i>ETV6-RUNX1</i> saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
<i>ETV6::RUNX1</i> -like bulguları saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	<i>Daha önce yer almamaktaydı</i>
<i>TCF3::PBX1</i> füzyonu saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3::PBX1</i> saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
<i>IGH::IL3</i> füzyonu saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	t(5;14)(q31.1;q32.2); <i>IGH::IL3</i> saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma
<i>TCF::HLF</i> füzyonu saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	<i>Daha önce yer almamaktaydı</i>
Diğer genetik anomaliler saptanan B-lenfoblastik lösemi/lenfoma	(Aynı)
WHO: Dünya Sağlık Örgütü, ALL: Akut lenfoblastik lösemi	

Tablo 7.2. B-ALL'de sitogenetik ve moleküler prognostik risk sınıflandırması

Risk grubu	Sitogenetik ve moleküler anomaliler
Standart risk	- Hiperdiploidi (51-65 kromozom) - Kromozom 4, 7 ve 10 iyi prognoz ile ilişkilendirilmektedir • t(12;21)(p13;q22): <i>ETV6::RUNX1</i>* • t(1;19)(q23;p13.3): <i>TCF3::PBX1</i> • <i>DUX4</i> yeniden düzenlenmeleri • <i>PAX5</i> P80R • t(9;22)(q34;q11.2): <i>BCR::ABL** IKZF1</i> plus*** yokluğunda ya da KML dışında
Kötü risk	- Hipodiploidi (<44 kromozom)**** <i>TP53</i> mutasyonu • <i>KMT2A</i> yeniden düzenlenmeleri [t(9;11) ve diğerleri] • <i>IGH</i> yeniden düzenlenmesi (IG::IL3) • <i>HLF</i> yeniden düzenlenmesi • <i>ZNF384</i> yeniden düzenlenmesi • <i>MEF2D</i> yeniden düzenlenmesi • <i>MYC</i> yeniden düzenlenmesi • <i>BCR::ABL</i>-like ALL - JAK-STAT (<i>CRLF2r</i>, <i>EPORr</i>, <i>JAK1/2/3r</i>, <i>TYK2r</i>, <i>SH2B3</i>, <i>IL7R</i>, <i>JAK1/2/3</i> mutasyonları) - ABL sınıfı (<i>ABL1</i>, <i>ABL2</i>, <i>PDGFRA</i>, <i>PDGFRB</i>, <i>FGFR</i> yeniden düzenlenmeleri) - Diğer (<i>NTRKr</i>, <i>FLT3r</i>, <i>LYNr</i>, <i>PTK2Br</i>) • <i>PAX5alt</i> • t(9;22)(q34;q11.2): <i>BCR::ABL1</i> + <i>IKZF1</i> plus ve/veya KML öyküsü • İntrakromozomal kromozom 21 amplifikasyonu (iAMP21) • <i>IKZF1</i> anomalileri • Kompleks karyotip (5 veya daha fazla kromozomal anomaliler)

*t(12;21) kriptik bir translokasyon olup, FISH veya PCR ile tespit edilebilir.

**Periferik kan örneğinde, granülosit hücrelerinde interfaz FISH testi (iFISH) *de novo* blast faz KML'den ayırım yapılabilmesi için önemlidir.

****IKZF1*plus: ERG delesyonu negatif, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PAX5*, *PAR1* delesyonları ve 22q11.22 delesyonları pozitif olmalıdır.

****Gerçek hipodiploidi ile maskelenmiş hipodiploidi ayırımına dikkat edilmelidir.

ALL: Akut lenfoblastik lösemi, KML: Kronik myeloid lösemi, FISH: Floresan in situ hibridizasyon, PCR: Polymerase chain reaction

7.2.1.1. Hipodiploid Karyotip

- ALL'de hipodiploidi bir veya daha fazla kromozomun kaybı ile ilişkilendirilmektedir.

- Hipodiploidi, pediatrik ve yetişkin ALL'lerin <%7'sinde görülmektedir.

- Hipodiploid hastaların %80'inde kromozom sayısı 45 olarak belirlenmiştir. Genellikle disentrik kromozomlar gözlenmekte ve bu olguların tipik hipodiploidi kadar kötü klinik tablo göstermediği bildirilmiştir.

- 3 alt sınıfı vardır;

Hipodiploidiye yakın karyotip (24-31 kromozom), düşük hipodiploid karyotip (32-39 kromozom), yüksek hipodiploid karyotip (40-44 kromozom).

- Hipodiploidiye yakın (24-31 kromozom) metafazlarda X/Y, 8, 10, 14, 18 ve 21 dizomileri görülmektedir.

- Hipodiploidiye yakın karyotipe eşlik eden mutasyonlar tanımlanmıştır (Tablo 7.3).

Tablo 7.3. Hipodiploidiye yakın karyotipli ALL'de gözlenen mutasyonlar

Genler	Sıklık
RAS yolağı mutasyonları	<i>NRAS</i> %15
	<i>FLT3</i> %98
	<i>KRAS</i> %3
	<i>PTPN11</i> %1
Reseptör tirozin kinaz mutasyonları	%70,6
<i>CDKN2A/B</i> , <i>RB1</i> , <i>PAX5</i> ve <i>CREBBP</i>	%31
<i>NF1</i>	>%44
<i>PAG1</i>	%10
<i>EP300</i> ve <i>EZH2</i>	<%5

- Düşük hipodiploid karyotipin (32-39 kromozom) pediatrik hastaların %0,5'inde ve yetişkinlerin ~%4'ünde gözlemlendiği; görülme sıklığının ise yaşa bağlı olarak arttığı ifade edilmektedir.

- Bu alt tipde X/Y, 1, 5, 6, 8, 10, 11, 14, 18, 19, 21 ve 22. kromozomların dizomileri görülmektedir.

- Düşük hipodiploidide saptanan genlerdeki mutasyonlar Tablo 7.4'te özetlenmiştir.

Tablo 7.4. Düşük hipodiploid karyotipli ALL'de gözlenen mutasyonlar

Genler	Sıklık
<i>TP53</i>	%91,2
<i>RB1</i>	%41,2
<i>IKZF2</i>	%52,9
<i>CDKN2A/2B</i>	%20
<i>CREBBP</i>	%60

- *TP53*'de genellikle ekson 5-8'de missense mutasyonlar meydana gelmektedir.
- Düşük diploid karyotip kötü prognostik etkiye sahip olup, özellikle kısa tedavi yanıtı, kısa olaysız sağkalım ve kısa OS ile ilişkilendirilmektedir.
- Maskelenmiş hipodiploid ALL, hipodiploid genomun reduplikasyonu ile oluşmaktadır.
- Maskelenmiş hipodiploid karyotiplerini tanımlamak için bazı özel durumlar belirlenmiştir.
- İlk olarak, çift düşük-hiperdiploid karyotipler 1, 8, 10, 11, 18, 19, 21 ve 22 kromozomlarının tetrazomilerini; çift haploidiye yakın karyotipler ise 14, 18, 21 ve X/Y kromozomların tetrazomilerini içermektedir.
- Bazı hastalarda, 50'den fazla kromozoma sahip karyotipler hiperdiploid olarak tanımlansa da, maskelenmiş hipodiploididen ayırımının yapılması gerekmektedir. Bu ayırımın doğru yapılmasının, prognoz kararını etkileyeceği unutulmamalıdır.
- Özellikle bu maskelenmiş hipodiploidiyi tanımlamada, SNP+aCGH kullanımının daha uygun olacağı vurgulanmaktadır (40).

7.2.1.2. Hiperdiploid Karyotip

- Akut lenfoblastik lösemide, hiperdiploidi iki alt gruba ayrılmaktadır. Yüksek hiperdiploid karyotip (51-65 kromozom), düşük hiperdiploid karyotip (47-50 kromozom).
- Yüksek hiperdiploid karyotip pediatrik ALL'lerin >%30'unu yetişkinlerin ise %10'unu oluşturmaktadır.

- Hiperdiploid ALL olan hastalarda genellikle X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 ve 21 numaralı kromozomlarda artış olduğu gözlenmektedir.
- Yüksek hiperdiploidi, iyi prognostik faktörler ile ilişkilendirilmektedir.
- +4, +10 ve +17 çok düşük relaps riski ile ilişkilidir.
- Yüksek hiperdiploidi olgularında, histon modifikasyonu (*CREBBP*, *WHSC1*, *SUV420H1*, *SETD2* ve *EZH2*) ve RTK-RAS yolu (*FLT3*, *NRAS*, *KRAS* ve *PTPN11*) ile ilişkili genlerde yüksek sıklıkta mutasyon saptanmıştır. Bu veriler, yüksek hiperdiploid pediatrik ALL hastaları için yeni hedeflenmiş terapilerin geliştirilebileceğini göstermektedir (40).

7.2.1.3. *KMT2A* Yeniden Düzenlenmeleri

- *Histon lizin [K]-metil transferaz 2A (KMT2A)* gen yeniden düzenlenmeleri, pediatrik hastaların %5'inde ve yetişkinlerin %10'unda görülmektedir.
- *KMT2A* yeniden düzenlenmeleri kötü prognozla ilişkilendirilmektedir.
- *KMT2A* >90 partner gen ile *KMT2A::?* füzyon genlerini oluşturmaktadır. Özellikle, *KMT2A::AFF1*, *KMT2A::MLLT3*, *KMT2A::MLLT1* füzyon genleri sıklıkla meydana gelmektedir.
- *KMT2A* yeniden düzenlenmelerinin topoizomeras II inhibitör tedavilerinden sonra geliştiği de gözlenmiştir.
- İlgili gen yeniden düzenlenmeleri olan olgularda, tirozin kinaz/PI3K/RAS sinyal yolları genlerinde de mutasyonlar gelişebilmektedir (40).

7.2.1.4. *ETV6::RUNX1*-alt Tipi ve *ETV6::RUNX1*-like ALL

- *ETV6::RUNX1* füzyonu, pediatrik prekürsör-B fenotip ALL'lerin ~%25'inde saptanmaktadır.
- Bu yüzden, ilgili hasta grubunda en yaygın genetik değişim olarak kabul edilmektedir.
- *ETV6::RUNX1* füzyonu lökomogenez sürecinde "ilk vuruş" olarak kabul edilmekte olup, tam lösemik transformasyon için sekonder genetik aberasyonların meydana gelmesi gerekmektedir.
- Bu sekonder aberasyonlar ise *ETV6*, *PAX5*, *ATF7IP* gibi genlerdeki farklı genetik değişimleri içermektedir.
- Bu belirtilen genlerin B-hücre matürasyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir.
- *ETV6::RUNX1* füzyonuna, en sık normal aleldeki 12p delesyonları eşlik etmektedir.

- Ayrıca *KMT2A* aberasyonları, 6q ve 9p delesyonları, bazı kromozomların trizomileri (kromozom 21, 4, 10 ve 16), ekstra *RUNX1* kopyası ve derivatif 21. kromozom gibi diğer genetik değişimlerinde eşlik edebildiği bildirilmiştir.

- Bu diğer genetik değişimler genellikle relaps hastalarında saptanmakta ve bu nedenle kötü prognostik kabul edilmektedir.

- *ETV6::RUNX1*-like ALL pediatrik B-ALL'lerin %2-3'ünü oluşturmaktadır.

- Ayrıca, *ETV6::RUNX1*-like alt tipinin >%80'si pediatrik olgularda görülmektedir.

- Bu olgularda, en sık *ETV6* füzyonları (*IKZF1::ETV6* ve *ETV6::ELMO1*); *TCF3::FLI1*, *ARPP21* delesyonları, *FUS::ERG* ve *IKZF1* yeniden düzenlenmeleri meydana gelmektedir.

- *ETV6::RUNX1*-like olgularında olumlu prognostik tablo olsa da; *ETV6::RUNX1*'e sahip olgulara göre kötü prognoz göstermektedir. Bu yüzden, ilgili alt tipe daha yoğun terapi önerilmektedir (40).

7.2.1.5. iAMP21

- iAMP21, kromozom 21'in intrakromozomal amplifikasyonu olarak tanımlanmaktadır.

- iAMP21 kötü prognozla ilişkilendirilmektedir.

- Kırık-füzyon-köprü mekanizmasıyla oluşan bu amplifikasyon bölgesi, *RUNX1* genini içermektedir.

- iAMP21'e olarak sekonder aberasyonlar gelişebilmektedir.

- Sekonder sitogenetik aberasyonlar ise kromozom X, 10 veya 14'ün artışı; monozomi 7/delesyon 7q; *ATM* ve *KMT2A* genleri içeren 11q delesyonları; *ETV6* ve *RB1* genlerinin delesyonlarıdır.

- iAMP21-ALL'nin >%60'sında RAS yolağı ile ilişkili genlerde mutasyonlar ve %20'sinde *P2RY8::CRLF2* gen füzyonu meydana geldiği gözlenmiştir.

- Robertsonian tipi translokasyonun [örneğin; t(15;21)(q10;q10)] ve ring kromozomunun disentrik doğası, iAMP21'in gelişebilme riskini artırmaktadır.

- iAMP21 anomalisine sahip olguların, düşük-yoğunluk dozaj ile tedavi edildiği zaman kötü prognoz gösterdiği belirtilmektedir (40).

7.2.1.6. *BCR::ABL1* ALL

- Ph kromozomu pediatrik ALL'lerin %3-4'ünde görülmekte olup; yaşa bağlı olarak ilgili anomalinin görülme sıklığı artmaktadır.

- Pediatrik ALL olgularında, oluşan proteinin 190 kD olduğu ve kötü prognoz (5 yıllık OS: <%10) ile ilişkilendirildiği bilinmektedir.
- Ph(+) olgularda, %80 *IKZF1*, %50 *PAX5* ve %14 *EBF1* genlerinin delesyonları bu anomaliye eşlik etmektedir.
- Ayrıca *CDKN2A/B* gen delesyonlarının da %50 oranında meydana geldiği bildirilmiştir.
- *IKZF1* ve *CDKN2A/B* genlerinin delesyonları da prognozu kötü olarak etkilemektedir (40).

7.2.1.7. *BCR::ABL1*-like ALL

- *BCR::ABL1*-like B-ALL'nin alt grubu olarak kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir.
- Çocukluk çağı ALL'nin ~%15'ini oluşturmaktadır.
- Ph(-) ALL'nin alt grubunda olmasına rağmen, Ph(+) ALL alt grubuna benzer gen ekspresyon profili göstermektedir.
- Ph-like ALL hastalarının ~%40'ında *IKZF1* mutasyonu görülmektedir.
- *BCR::ABL1*-like imzanın varlığı, kötü prognozla ilişkilendirilmektedir.
- Bu imza, tirozin kinaz yollarını aktive eden genlerin füzyonlarını ve mutasyonlarını içermektedir.
- Bu gen füzyonları ve mutasyonları; ABL-sınıf yeniden düzenlenmeleri (*ABL1*, *ABL2*, *PDGFRA*, *PDGFRb*, *FGFR*), JAK-STAT yeniden düzenleme ve/veya mutasyonları (*CRLF2*, *EPOR*, *JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, *TYK2*, *SH2B3*, *IL7R*); *FLT3*, *NTRK3*, *LYN* ve *PTK2B* genlerindeki diğer yeniden düzenlenmeleridir.
- *BCR::ABL1*-like ALL'deki genetik profilendirme çalışmalarında, özellikle sitokin reseptör veya kinaz-aktive eden değişimlerin meydana geldiği gözlenmiştir.
- İlgili değişimlere yönelik tasarlanan ABL sınıfı veya *JAK* küçük molekül inhibitörlerinin önemi göz ardı edilemeyecek niteliktedir (40).

7.2.1.8. t(1;19) ve t(17;19)

- t(1;19) translokasyonu pediatrik B-ALL olgularının >%6'sında gözlenmektedir.
- Bu yeniden düzenlenmenin genellikle dengesiz olduğu ve *PBX1* distalinin duplikasyonu ile sonuçlandığı bilinmektedir.
- Ayrıca bu translokasyon, homeobox gen *PBX1*'in C-ter bölgesi ile *TCF3*'ün transaktivasyon domainin füzyonuna neden olmaktadır.
- *TCF3*, erken lenfoid gelişimi için gerekli transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır.

- *PBX1* ise lenfoid prekürsörlerin gelişmesi için gerekli homeodomain ailesini kodlamaktadır.
- *TCF3-PBX1* füzyon protein, *HOX* proteinlerine bağlanmaktadır. Bu yüzden, *HOX* ile regüle edilen gen ekspresyonun bozulmakta ve hematopoietik farklılaşmayı etkileyebilmektedir.
- *t(17;19)* translokasyonunda *TCF3*'ün C-ter ile *HLF*'nin dimerizasyon bölgesi ile füzyon yapılmaktadır.
- Oluşan füzyon genin, *LMO2* ve *BCL2* gibi genlerin anormal ekspresyonuna sebep olduğu bilinmektedir.
- *TCF3::HLF* genellikle erişkin ALL'de görülmekte ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (41).
- *t(17;19)(q22;p13)* sonucu oluşan *TCF3::HLF* füzyon geni pediatrik ALL'nin nadir alt tipini (%1) tanımlamak için kullanılmakta ve kötü prognozla ilişkilendirilmektedir.
- *TCF3::PBX1* füzyon geni ise pediatrik ALL'lerin ~%5'ini oluşturmakta ve orta prognostik bir belirteç olarak kabul görmektedir (40).

7.2.2. Kromozomal Anomaliler İçin Laboratuvar Uygulama Önerileri

- Akut lösemilerde kromozomal anomaliler için örnek Kİ dokusudur.
 - Eğer blast oranı yüksek ise periferik kan örneği de analizler için uygundur.
 - Hücre kültürü temelli yöntemlerde anti-koagülan tüpler olarak heparinli tercih edilmektedir.
 - Aspirasyon sonrası Kİ örneği kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır ve Kİ örneği en az 1 mL olmalıdır.
 - Kromozom analizi için 24 ve 48 saatlik kültürler hazırlanmalıdır.
 - ALL örneklerinde yüksek kolsemid konsantrasyonu veya uzun süreli muamelesi metafaz plakları elde etme oranını düşürmektedir.
 - ALL'de *in vitro* hücre ölümü önemli bir durum olduğu için ilgili tanının pratiğinde çoklu kültürler önerilmektedir.
 - B-ALL'de konvansiyonel sitogenetik altın standart kabul edilmektedir. Ancak, füzyon genlerin saptanmasında floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ve reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) kullanılması önerilmektedir.
 - FISH paneli;
- Kromozom 4, 10 ve 17 sentromerlerini,

t(12;21), t(9;22), t(1;19), t(17;19), *MLL*, *ABL1*, *ABL2*, *PDGFRB*, *CDKN2A* ve t(X;14)'ü hedef almalıdır.

- Kromozom 4, 10, 17'nin hedeflenmesi hiperdiploidinin belirlenmesi amacıyla önerilmektedir.
- t(12;21)'in tespiti için çift renkli, çift füzyon FISH probu kullanılmalıdır. Bu test iAMP21'in tespit edilmesine olanak sağlar.
- Translokasyonlar sonucunda oluşan füzyon gen transkriptleri PCR yöntemleri ile de analiz edilebilir.
- Mutasyon saptanan genlerin analizleri için ise yeni nesil sekanslama (NGS) platformları önerilmektedir (bkz Bölüm 9).

7.3. T-Akut Lenfoblastik Lösemi

T-hücreli ALL (T-ALL) pediatrik ALL hastalarının %15'ini ve erişkin hastaların ise %25'ini oluşturmaktadır. İlgili lösemi tipinin ALL'nin agresif tipi olarak kabul edilmesine rağmen, özellikle MRD yönelik geliştirilen yöntemlerle önemli gelişmeler sağlandığı görülmektedir.

7.3.1. Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri

7.3.1.1. Prognostik Genetik Faktörler

T-ALL'nin genetik alt yapısının onkogenler ve onkosüpresörlerde gerçekleşen değişimler sonucu oluştuğu gözlenmiştir. Bu onkogenler ve onkosüpresörler bazı önemli hücresel süreçlerdeki etkilerinden dolayı, lösemnin gelişmesi ve/veya progresyonu ile ilişkilendirilmektedir. Söz konusu genetik alt yapıda driver onkojenik kanıt sunan anomaliler tip A ve B olarak gruplandırılmaktadır. Tip A anomalileri, T-hücre gelişimi, matürasyonu ve farklılaşma ve hematopoezde önemli transkripsiyon faktörleri kodlayan onkogenlerin upregülasyonunu içermektedir. Tip B anomalileri ise epigenetik faktörler, tirozin kinazlar, sinyal yolak proteinleri ve ribozomal proteinler gibi farklı protein ailelerini kodlayan genlerdeki anomalileri ifade etmektedir (42).

Kromozomal aberasyonlar, T-ALL hastalarının %50-70'inde tespit edilebilmektedirler. En yaygın sitogenetik aberasyonların, onkojenik transkripsiyon faktörlerinin aberan ekspresyonuna sebep olan translokasyonları içerdiği görülmektedir. Ayrıca bu onkogenler baz alınarak, T-ALL'nin moleküler alt grupları oluşturulmaktadır. Delesyon 9p (%65-70) ve 6q (%20-30) gibi kopya sayısı değişimlerinin yanı sıra diğer non-subgrup-spesifik tekrarlayan aberasyonlar görülmektedir (www.mll.com).

T-ALL'nin, aktive edici *NOTCH1* mutasyonları ile *TLX1 (HOX11)*, *TLX3 (HOX11L2)*, *LYL1*, *TAL1* ve *KMT2A* transkripsiyon faktörlerinin yeniden düzenlemeleriyle karakterize olduğu görülmektedir. T-ALL olgularının %50'sinden daha fazlasında *NOTCH1* mutasyonları, %10-15'inde ise *NOTCH1* aktivasyonuna sebep olan *FBXWY* mutasyonları gözlenmektedir. İlgili gen mutasyonları olumlu prognoz ve düşük MRD seviyeleriyle ilişkili bulunmuştur. T-ALL'de tanımlanan mutasyonlarının hastalık prognozuna etkilerinin net olmamasından dolayı, risk sınıflanmasında yer almadığı ifade edilmiştir <https://siope.eu/ESCP/members>.

7.3.1.2. Kromozomal Anomaliler İçin Laboratuvar Uygulama Önerileri

- B-ALL'de olduğu gibi kromozom anomalilerin tespiti için Kİ örneği tercih edilmelidir.

- Heparinli tüpler içerisinde, en kısa sürede örneklerin laboratuvara ulaştırılması gerekmektedir.

- 24 ve 48 saatlik kültürler ile çalışılması önerilmektedir.

- T-ALL FISH panelinin aşağıdaki anomalileri hedeflemesi önerilmektedir.

<https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/overview/609567>.

- +9/9p-, *CDKN2A::D9Z1*

- t(9;22) ve *ABL1* amplifikasyonu, *ABL1::BCR*

- 11q23 yeniden düzenlenme, *MLL (KMT2A)* break apart

- -17/17p-, *TP53::D17Z1*

- t(5;14), *TLX3::BCL11B*

- 7q34 yeniden düzenlenme, *TRB* break apart

- 14q11.2 yeniden düzenlenme, *TRAD* break apart

- t(10;11), *MLLT10::PICALM*

- 1p33 yeniden düzenlenme, *TAL1/STIL*

- t(9;22)'yi hedefleyen prob çift füzyon, çift renkli olmalıdır ve eğer ekstra bir *ABL* sinyali saptanır ise *ABL* break apart prob ile FISH testi çalışılmalıdır. Böylelikle *ABL* yeniden düzenlenmesi ile trizomi arasındaki ayırım yapılabilir.

- *MLL* break apart prob ile yapılan FISH çalışmasının pozitif sonuçlanması durumunda, partnerin belirlenmesi için aşağıdaki anomalilere yönelik FISH testi çalışılmalıdır.

- t(11;19)(q23;p13.3) *MLL::MLLT1*

- t(6;11)(q27;q23) *MLLT4(AFDN)::MLL*

- t(4;11)(q21;q23) *AFF1::MLL*

- t(9;11)(p22;q23) *MLLT3::MLL*
- t(10;11)(p12;q23) *MLLT10::MLL*
- t(11;19)(q23;p13.1) *MLL::ELL*

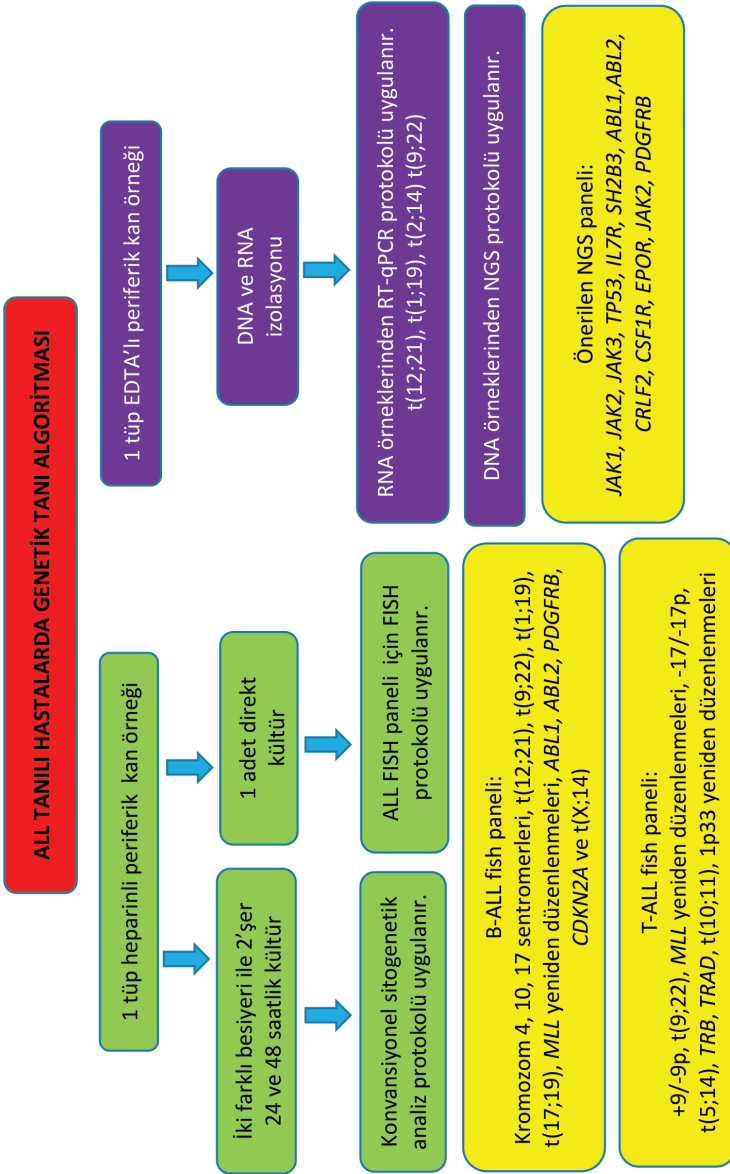
- *TRB* break apart prob ile yapılan FISH çalışmasının pozitif sonuçlanması durumunda, partnerin belirlenmesi için aşağıdaki anomalilere yönelik FISH testi çalışılmalıdır.

- t(7;10)(q34;q24) *TRB::TLX1*
- t(7;11)(q34;p15) *TRB::LMO1*
- t(7;11)(q34;p13) *TRB::LMO2*
- t(6;7)(q23;q34) *MYB::TRB*

Gen mutasyonları ve füzyon genler için ise NGS yöntemleri kullanılmaktadır.

Özet;

- WHO sitogenetik yöntemlerin dışında metotların kullanımına imkan sunulması amacıyla terminolojide değişiklikler yapmıştır.
- Sınıflandırmaya *ETV6::RUNX1*-like B-ALL sınıfı eklenmiştir.
- Birçok yeni anomaliler tanımlanmaya başlamıştır (örneğin; *DUX4*, *MEF2D*, *ZNF384* ve *NUMT1* yeniden düzenlenmeleri, *IGH::MYC* füzyonu, *PAX5alt* ve *PAX5 p.P80R*).
- B-ALL'de standart risk ile ilişkilendirilen genetik anomaliler; hiperdiploidi (51- 65 kromozom), t(12;21)(p13;q22): *ETV6::RUNX1*, t(1;19)(q23;p13.3): *TCF3::PBX1*, *DUX4* yeniden düzenlenmeleri, *PAX5 P80R*, t(9;22)(q34;q11.2): *BCR::ABL*, *IKZF1* plus.
- B-ALL'de kötü prognostik risk ile ilişkilendirilen genetik anomaliler; hipodiploidi (<44 kromozom), *TP53* mutasyonu, *KMT2A* yeniden düzenlenmeleri [t(9;11) ve diğerleri], *IGH* yeniden düzenlenmesi [*IG::IL3*], *HLF* yeniden düzenlenmesi, *ZNF384* yeniden düzenlenmesi, *MEF2D* yeniden düzenlenmesi, *MYC* yeniden düzenlenmesi, *BCR::ABL1*-like ALL [JAK-STAT (*CRLF2r*, *EPORr*, *JAK1/2/3r*, *TYK2r*, *SH2B3*, *IL7R*, *JAK1/2/3* mutasyonları) *ABL* sınıfı (*ABL1*, *ABL2*, *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR* yeniden düzenlenmeleri) diğer (*NTRKR*, *FLT3r*, *LYNR*, *PTK2Br*)], *PAX5alt*, t(9;22)(q34;q11.2): *BCR::ABL1* + *IKZF1* plus ve/veya KML öyküsü, intrakromozomal kromozom 21 amplifikasyonu (*iAMP21*), *KZF1* anomalileri, kompleks karyotip (5 veya daha fazla kromozomal anomaliler).
- t(12;21) kriptik bir translokasyon olup, FISH veya PCR ile tespit edilebilir.
- T-ALL'de FISH paneli; +9/9p-, *CDKN2A::D9Z1*, t(9;22) ve *ABL1* amplifikasyonu, *ABL1::BCR*, 11q23 yeniden düzenlenme, *MLL* (*KMT2A*) break apart, -17/17p-, *TP53::D17Z1*, t(5;14), *TLX3::BCL11B*, 7q34 yeniden düzenlenme, *TRB* break apart, 14q11.2 yeniden düzenlenme, *TRAD* break apart, t(10;11), *MLLT10::PICALM*, 1p33 yeniden düzenlenme, *TAL1/STIL* T-ALL'nin, aktive edici *NOTCH1* mutasyonları ile *TLX1* (*HOX11*), *TLX3* (*HOX11L2*), *LYL1*, *TAL1* ve *KMT2A* transkripsiyon faktörlerinin yeniden düzenlemeleriyle karakterize olduğu görülmektedir.



Kaynaklar

1. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* 2017;7:e577.
2. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IBO, Berti E, Bhagat G, Borges AM, Boyer D, Calaminici M, Chadburn A, Chan JKC, Cheuk W, Chng WJ, Choi JK, Chuang SS, Coupland SE, Czader M, Dave SS, de Jong D, Du MQ, Elenitoba-Johnson KS, Ferry J, Geyer J, Gratzinger D, Guitart J, Gujral S, Harris M, Harrison CJ, Hartmann S, Hochhaus A, Jansen PM, Karube K, Kempf W, Khoury J, Kimura H, Klapper W, Kovach AE, Kumar S, Lazar AJ, Lazzi S, Leoncini L, Leung N, Leventaki V, Li XQ, Lim MS, Liu WP, Louissaint A Jr, Marcogliese A, Medeiros LJ, Michal M, Miranda RN, Mitteldorf C, Montes-Moreno S, Morice W, Nardi V, Naresh KN, Natkunam Y, Ng SB, Oschlies I, Ott G, Parrens M, Pulitzer M, Rajkumar SV, Rawstron AC, Rech K, Rosenwald A, Said J, Sarkozy C, Sayed S, Saygin C, Schuh A, Sewell W, Siebert R, Sohani AR, Tooze R, Traverse-Glehen A, Vega F, Vergier B, Wechalekar AD, Wood B, Xerri L, Xiao W. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022;36:1720-1748.
3. Lejman M, Chałupnik A, Chilimoniuk Z, Dobosz M. Genetic Biomarkers and Their Clinical Implications in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *Int J Mol Sci* 2022;23:2755.
4. Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 2012;122:3407-3415.
5. Bardelli V, Arniani S, Pierini V, Di Giacomo D, Pierini T, Gorello P, Mecucci C, La Starza R. T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Biomarkers and Their Clinical Usefulness. *Genes (Basel)* 2021;12:1118.

HEMATOLOJİK
MALİGNİTELERDE GENETİK
ALGORİTMA KILAVUZU

VIII. BÖLÜM

MULTİPL MYELOMA

Yazarlar:
Sevgi Işık
Sevilhan Artan



8. MULTİPL MYELOMA

Multipl myeloma (MM), klinik heterojenite gösteren ve tedavi edilemeyen plazma hücre malignitesi olarak tanımlanmaktadır. MM'nin tüm hematolojik malignitelerin %10'unu oluşturduğu ve erişkin dönemde (medyan yaş: 65) görüldüğü ifade edilmektedir (43).

8.1. Tanı ve Sınıflandırma

International Myeloma Working Group'a göre MM tanısı için aşağıdaki iki kriterin karşılanması gerekmektedir;

- Klonal kemik iliği (Kİ) plazma hücreleri $\geq$ %10 veya biyopsi ile kanıtlanmış kemik veya ekstremiteler plazmasitom,
- Aşağıdaki myelomu tanımlayan olaylardan herhangi biri veya daha fazlasının saptanması.
 - Altta yatan plazma hücresi proliferatif bozukluğuna atfedilebilecek son organ hasarının kanıtı, özellikle: kalsemi, böbrek yetmezliği, anemi, kemik lezyonları
 - Klonal Kİ plazma hücresi yüzdesi $\geq$ %60
 - Free light chain oranı $\geq$ 100 (serbest hafif zincir seviyesi $\geq$ 100 mg/L olmalıdır)
 - Magnetic resonance imaging çalışmalarında >1 fokal lezyon (en az 5 mm boyutunda)

8.2. Prognostik Genetik Faktörler ve Analiz Yöntemleri

8.2.1. Prognostik Genetik Faktörler

MM tek bir hastalık olarak kabul edilse de, aslında sitogenetik açıdan farklı plazma hücre malignitelerinin birikimidir (Tablo 8.1) (43).

- Trizomiler ve IgH translokasyonları primer sitogenetik anomaliler (SA) olarak kabul edilmektedir.
- Hastalık seyri boyunca 1q artışı, del(1p), del(13) ve MYC translokasyonlarının dahil olduğu ikincil anomaliler ortaya çıkar.
- Tespit edilen anomaliler hastalık fazı ile ilişkilidir (Tablo 8.2).
- Bir hastada 400'den fazla mutasyon gelişmektedir ve en sık mutasyona uğrayan genler immünoglobulin ağır ve hafif zincir genleri, *NRAS*, *KRAS* ve *BRAF* genleridir (43).

Tablo 8.1. MM'de primer moleküler sitogenetik sınıflandırma

Alt tip	Gen/kromozom	Görülme sıklığı (%)
Hiperdiploid MM	1, 13 ve 21. kromozomlar hariç, tek sayı olarak nitelendirilen (3, 5, 7 vb.) kromozomları içeren tekrarlayan trizomiler	45
IgH translokasyonu pozitif MM		40
t(11;14)(q13;q32)	<i>CCND1</i>	20
t(6;14)(p21;q32)	<i>CCND3</i>	5
t(4;14)(p16;q32)	<i>NSD2</i>	10
t(14;16)(q32;q23)	<i>C-MAF</i>	4
t(14;20)(q32;q11)	<i>MAFB</i>	<1
Diğer IgH translokasyonları, diğer sitogenetik anomaliler ya da normal karyotip		5
MM: Multipl miyelom		

Revised International Staging System (RISS) tümör yükü (ISS) ve hastalık biyolojisini göz önünde bulundurarak bir prognostik indeks oluşturmaktadır (Tablo 8.3) (44).

RISS'de yaygın görülen 3 tip SA belirteç olarak kullanılırken Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) ek ayrıntılara da yer vermektedir (Tablo 8.4).

MM'de saptanan gen mutasyonlarından *KRAS* mutasyonlarının, prognostik etkisinin nötral, *NRAS* mutasyonlarının ise kötü prognozla ilişkilendirildiği bilinmektedir. *TP53*, *ATR*, *ATM*, *ZFX4* ve *BRAF* gen mutasyonlarının sağkalım üzerinde olumsuz etkileri bulunurken, *EGR1*, *IRF4* ve *TRAF3* gen mutasyonlarının iyi prognozla ilişkisi gözlenmiştir. Son olarak *FAM46C* gen mutasyonlarının prognostik etkisi olmadığı bildirilmiştir (45).

8.2.2. Analiz Yöntemleri

- MM konvansiyonel ve moleküler sitogenetik analizler Ki'den veya doku spesifik çalışılmalıdır.

Tablo 8.2. Sitogenetik anomaliler ile klinik bulgular ve prognoz arasındaki ilişki

Sitogenetik anormali	Anomalinin saptandığı klinik evre	
	Smoldering multipl myeloma	Multipl myeloma
Trizomiler	Ortalama-risk, ortalama TTP 3 yıl	İyi prognoz, standart-risk, medyan OS 7-10 yıl, lenalidomid bazlı tedaviye mükemmel yanıt
t(11;14) (q13;q32)	Ortalama-risk, ortalama TTP 5 yıl	İyi prognoz, standart-risk, medyan OS 7-10 yıl
t(6;14)(p21;q32)	Standart-risk, ortalama TTP 5 yıl	İyi prognoz, standart riskli MM, medyan OS 7-10 yıl
t(4;14)(p16;q32)	Yüksek-risk, ortalama TTP 2 yıl	Ortalama-risk, medyan OS 5 yıl, bortezomid bazlı başlangıç terapiye ihtiyaç, erken ASCT, ardından bortezomib bazlı konsolidasyon tedavisi
t(14;16) (q32;q23)	Standart-risk, ortalama TTP 5 yıl	Yüksek-risk, medyan OS 3 yıl, yüksek düzeyde FLC ile ilişkilidir ve %25'i ilk MDE olarak akut böbrek yetmezliği ile ortaya çıkar
t(14;20) (q32;q11)	Standart-risk, ortalama TTP 5 yıl	Yüksek-risk, medyan OS 3 yıl
1q21 artışı	Yüksek-risk, ortalama TTP 2 yıl	Orta-risk, medyan OS 5 yıl
Del(17p)	Yüksek-risk, ortalama TTP 2 yıl	Yüksek-risk, medyan OS 3 yıl
Trizomiler ve bir IgH translokasyonu	Standart-risk, ortalama TTP 5 yıl	Yüksek riskli IgH translokasyonları ve del 17p tarafından sağlanan olumsuz prognozu iyileştirebilir
İzole monozomi 13 veya izole monozomi 14	Standart-risk, ortalama TTP 5 yıl	Prognostik etkisi net değil
Normal	Düşük-risk, ortalama TTP 7-10 yıl	İyi prognoz, muhtemelen düşük tümör oranını yansıtmakta, medyan OS >7-10 yıl

TTP: Time to progression, OS: Overall survival, ASCT: Otolog kök hücre nakli, FLC: Free light chain

Tablo 8.3. MM’de standart risk faktörleri ve RISS

ISS evre	
I	Serum β 2-mikroglobulin $<3,5$ mg/L, serum albümin $\geq 3,5$ g/dL
II	ISS evre I veya III değil
III	Serum β 2-mikroglobulin $\geq 5,5$ mg/L
SA	
Yüksek risk	del(17p) ve/veya translokasyon t(4;14) ve/veya translokasyon t(14;16) varlığı
Standart risk	Yüksek risk SA bulunmaması
LDH	
Normal	Serum LDH $<$ normalin üst sınırı
Yüksek	Serum LDH $>$ normalin üst sınırı
RISS evre	
I	iFISH ve normal LDH’ye göre ISS aşama I ve standart riskli SA
II	RISS evre I ve III değil
III	ISS evre III ve iFISH ile yüksek riskli SA veya yüksek LDH
MM: Multipl myeloma, RISS: Revised International Staging System, ISS: Tümör yükü, LDH: Laktat dehidrogenaz, SA: Sitogenetik anomali, iFISH: İnterfaz FISH	

Tablo 8.4. Mayo Clinic Risk sınıflandırması (mSMART)

Risk grup	Anomali saptanan yeni tanı hastalarının yüzdesi
Standart risk	%60
Trizomiler t(11;14) t(6;14)	
Yüksek risk	%40
t(4;14) t(14;16) t(14;20) del(17p) 1q artışı Duble-hit myeloma: Herhangi 2 yüksek risk faktörü Triple-hit myeloma: Herhangi 3 ya da daha fazla yüksek risk faktörü	

- Kİ örneğinin ilk aspirat olması ve heparinli tüp içerisinde uygun zamanda gönderilmesi tercih edilmektedir.

- MM'de klonal aberasyon saptama oranı %20-50 olması nedeniyle;
- Plazma hücrelerinin saflaştırılması ve spesifik olarak tanımlanması için CD138+ antikorları kullanılması gerekmektedir.
- CD138+ plazma hücrelerinin pozitif seleksiyonu için manyetik-boncuk sistemleri tercih edilmektedir.

- MM olgularına çalışılması önerilen FISH paneli;

- IGH breakapart prob
- 1p32/1q21 lokus spesifik prob
- P53/cep17 lokus spesifik prob
- 13q14/13q34 lokus spesifik prob
- MYC BA prob
- Kopya sayılarını belirlemek için 3, 5, 7 numaralı kromozomları hedef alan problemler içermelidir.

- Yukarıda klinik önemi bilinen problemlerin eşik değeri, laboratuvara göre ve antikor ile saflaştırma yapıp yapılmamasına göre belirlenmelidir (antikor ile saflaştırma yapıldığında önerilen eşik değerleri: Füzyon ve breakapart problemler için %10, sayısal anomaliler tespit etmede kullanılan problemler için ise %20).

- Deneyimli personeller tarafından en az 200 nükleus değerlendirilmelidir.

- Konvansiyonel sitogenetik ile plazma hücrelerinde metafaz elde etme zorluğu sebebiyle interfaz FISH oldukça önem kazanmaktadır.

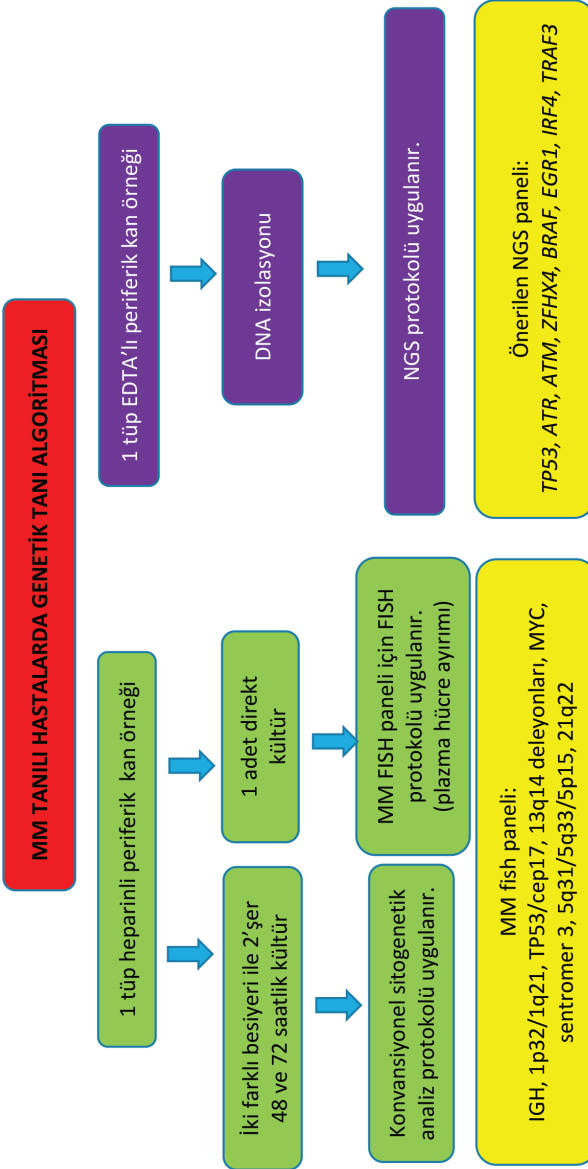
- Konvansiyonel sitogenetik için özellikle uzun süreli kültür (48-72 saat) yapılmalıdır. Ayrıca 12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat ve sitokinler (interlökin 6 ve granülosit-makrofaj koloni-stimüle edici faktör) gibi stimüle edici faktörler kullanılmalıdır.

- Raporlarda plazma hücrelerin oranı, kullanılan yöntem ve elde sonuçlar açıkça ifade edilmelidir (46).

- Gen mutasyonlarının analizi için ise NGS tabanlı sistemler kullanılabilir (bkz Bölüm 9).

Özet;

- MM sitogenetik açıdan farklı plazma hücrelerinin birikimidir.
- Hiperdiploid karyotip (1, 13 ve 21. kromozomlar hariç) %45 oranında saptanır.
- *IGH* translokasyonlarının görülme sıklığı %40'dır.
- %5 oranında da diğer SA'lar saptanır.
- Trizomiler ve *IGH* translokasyonları primer anomaliler olarak kabul edilmektedir.
- 1q artışı, del(1p) ve *MYC* translokasyonları ise ikincil anomaliler arasında yer almaktadır.
- Saptanan SA'lar hastalık fazı ile ilişkilidir.
- Hastalık risk sınıflandırmasında SA'lardan faydalanılmaktadır.
- ISS'de del(17p), t(4;14) ve t(4;16) yüksek risk olarak değerlendirilir.
- mSMART'a göre trizomiler, t(11;14) ve t(6;14) standart risk; t(4;14), t(14;16), t(14;20), del(17p), 1q artışı, duble-hit myeloma ve triple-hit myeloma yüksek risk grubunda yer almaktadır.
- Sitogenetik analizler için heparinli tüpe alınmış Ki örneği tercih edilmelidir.
- CD138+ plazma hücrelerinin izole edilmesi gerekmektedir.
- FISH çalışmalarında eşik değerleri CD138+ hücrelerin izole edilip edilememesine göre değişkenlik göstermektedir.
- Konvansiyonel sitogenetik analiz için 48-72 saatlik kültürler tercih edilmelidir.
- MM'de sık gözlenen mutasyonlar için NGS analizleri yapılabilir.



Kaynaklar

1. Qian H, Gang D, He X, Jiang S. A review of the therapeutic role of the new third-generation TKI olverembatinib in chronic myeloid leukemia. *Front Oncol* 2022;12:1036437.
2. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2022 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol* 2022;97:1236-1256.
3. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, Clark RE, Cortes JE, Deininger MW, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Hughes TP, Janssen JJWM, Kantarjian HM, Kim DW, Larson RA, Lipton JH, Mahon FX, Mayer J, Nicolini F, Niederwieser D, Pane F, Radich JP, Rea D, Richter J, Rosti G, Rousselot P, Saglio G, Sauße S, Soverini S, Steegmann JL, Turkina A, Zaritskey A, Hehlmann R. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2020;34:966-984.
4. Benchikh S, Bousfiha A, Hamouchi AE, Soro SGC, Malki A, Nassereddine S. Chronic myeloid leukemia: cytogenetics and molecular biology's part in the comprehension and management of the pathology and treatment evolution. *Egypt J Med Hum Genet* 2022;23:29.
5. Chauffaille Mde L, Bandeira AC, da Silva AS. Diversity of breakpoints of variant Philadelphia chromosomes in chronic myeloid leukemia in Brazilian patients. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2015;37:17-20.
6. Shetty D, Talker E, Jain H, Talker J, Patkar N, Subramanian P, Jain H, Bonda A, Punatar S, Gokarn A, Bagal B, Sengar M, Khattry N. Evaluation of cytogenetic response in CML patients with variant Philadelphia translocation. *Asia Pac J Clin Oncol* 2022;18:99-108.
7. Bennour A, Sennana H, Laatiri MA, Elloumi M, Khelif A, Saad A. Molecular cytogenetic characterization of variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia: genesis and deletion of derivative chromosome 9. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;194:30-37.
8. Krishna Chandran R, Geetha N, Sakthivel KM, Suresh Kumar R, Jagathnath Krishna KMN, Sreedharan H. Impact of Additional Chromosomal Aberrations on the Disease Progression of Chronic Myelogenous Leukemia. *Front Oncol* 2019;9:88.
9. Işık S, Günden G, Üsküdar Teke H, Akay OM, Oğuz Davutoğlu N, Aslan V, Karagülle M, Özen H, Çilingir O, Artan S, Durak Aras B. The Impact of Cytogenetic Aberrations in the Clonal Evolution of Chronic Myeloid Leukemia: A Single-Center Experience Among 450 Turkish Patients (Cohort Study). *Turk J Haematol* 2022;39:237-244.
10. Izzo B, Gottardi EM, Errichiello S, Daraio F, Barate C, Galimberti S. Monitoring Chronic Myeloid Leukemia: How Molecular Tools May Drive Therapeutic Approaches. *Front Oncol* 2019;9:833.
11. Tadesse F, Asres G, Abubeker A, Gebremedhin A, Radich J. Spectrum of BCR-ABL Mutations and Treatment Outcomes in Ethiopian Imatinib-Resistant Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *JCO Glob Oncol* 2021;7:1187-1193.
12. Arora R, Press RD. Measurement of BCR-ABL1 transcripts on the International Scale in the United States: current status and best practices. *Leuk Lymphoma* 2017;58:8-16.
13. Jones D, Kamel-Reid S, Bahler D, Dong H, Elenitoba-Johnson K, Press R, Quigley N, Rothberg P, Sabath D, Viswanatha D, Weck K, Zehnder J. Laboratory practice guidelines for detecting and

- reporting BCR-ABL drug resistance mutations in chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2009;11:4-11.
14. Greenfield G, McMullin MF, Mills K. Molecular pathogenesis of the myeloproliferative neoplasms. *J Hematol Oncol* 2021;14:103.
 15. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, Bejar R, Berti E, Busque L, Chan JKC, Chen W, Chen X, Chng WJ, Choi JK, Colmenero I, Coupland SE, Cross NCP, De Jong D, Elghetany MT, Takahashi E, Emile JF, Ferry J, Fogelstrand L, Fontenay M, Germing U, Gujral S, Haferlach T, Harrison C, Hodge JC, Hu S, Jansen JH, Kanagal-Shamanna R, Kantarjian HM, Kratz CP, Li XQ, Lim MS, Loeb K, Lohgavi S, Marcogliese A, Meshinchi S, Michaels P, Naresh KN, Natkunam Y, Nejati R, Ott G, Padron E, Patel KP, Patkar N, Picarsic J, Platzbecker U, Roberts I, Schuh A, Sewell W, Siebert R, Tembhare P, Tyner J, Verstovsek S, Wang W, Wood B, Xiao W, Yeung C, Hochhaus A. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022;36:1703-1719.
 16. Mayerhofer C, Niemeyer CM, Flotho C. Current Treatment of Juvenile Myelomonocytic Leukemia. *J Clin Med* 2021;10:3084.
 17. Gerds AT, Gotlib J, Ali H, Bose P, Dunbar A, Elshoury A, George TI, Gundabolu K, Hexner E, Hobbs GS, Jain T, Jamieson C, Kaesberg PR, Kuykendall AT, Madanat Y, McMahon B, Mohan SR, Nadiminti KV, Oh S, Pardanani A, Podoltsev N, Rein L, Salit R, Stein BL, Talpaz M, Vachhani P, Wadleigh M, Wall S, Ward DC, Bergman MA, Hochstetler C. Myeloproliferative Neoplasms, Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2022;20:1033-1062.
 18. Palumbo GA, Stella S, Pennisi MS, Piroso C, Fermo E, Fabris S, Cattaneo D, Iurlo A. The Role of New Technologies in Myeloproliferative Neoplasms. *Front Oncol* 2019;9:321.
 19. Sekeres MA, Taylor J. Diagnosis and Treatment of Myelodysplastic Syndromes: A Review. *JAMA* 2022;328:872-880.
 20. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F, Kantarjian H, Kuendgen A, Levis A, Malcovati L, Cazzola M, Cermak J, Fonatsch C, Le Beau MM, Slovak ML, Krieger O, Luebbert M, Maciejewski J, Magalhães SM, Miyazaki Y, Pfeilstöcker M, Sekeres M, Sperr WR, Stauder R, Tauro S, Valent P, Vallespi T, van de Loosdrecht AA, Germing U, Haase D. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012;120:2454-2465.
 21. DeZern AE, Greenberg PL. Recent Clinical and Molecular Advances for the Classification of Myelodysplastic Neoplasms. *J Natl Compr Canc Netw* 2022;20:1280-1283.
 22. Schlegelberger B, Mecucci C, Wlodarski M. Review of guidelines for the identification and clinical care of patients with genetic predisposition for hematological malignancies. *Fam Cancer* 2021;20:295-303.
 23. Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Rev* 2017;31:63-76.
 24. Alibhai SM, Leach M, Minden MD, Brandwein J. Outcomes and quality of care in acute myeloid leukemia over 40 years. *Cancer* 2009;115:2903-2911.

25. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Godley LA, Hasserjian RP, Larson RA, Levine RL, Miyazaki Y, Niederwieser D, Ossenkoppele G, Röllig C, Sierra J, Stein EM, Tallman MS, Tien HF, Wang J, Wierzbowska A, Löwenberg B. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* 2022;140:1345-1377.
26. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol* 2019;94:1266-1287.
27. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46:219-234.
28. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48:198-206.
29. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2016;17:779-790.
30. Wierda WG, Brown J, Abramson JS, Awan F, Bilgrami SF, Bociek G, Brander D, Chanan-Khan AA, Coutre SE, Davis RS, Eradat H, Fletcher CD, Gaballa S, Ghobadi A, Hamid MS, Hernandez-Ilizaliturri F, Hill B, Kaesberg P, Kamdar M, Kaplan LD, Khan N, Kipps TJ, Ma S, Mato A, Mosse C, Schuster S, Siddiqi T, Stephens DM, Ujjani C, Wagner-Johnston N, Woyach JA, Ye JC, Dwyer MA, Sundar H. NCCN Guidelines® Insights: Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma, Version 3.2022. *J Natl Compr Canc Netw* 2022;20:622-634.
31. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840-1847.
32. Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM, Wierda WG, Stingo F, Plunkett W, Smith SC, Kantarjian HM, Freireich EJ, Keating MJ. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2016;127:303-309.
33. Crombie J, Davids MS. IGHV mutational status testing in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2017;92:1393-1397.
34. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stilgenbauer S, Stevenson F, Davi F, Rosenquist R; European Research Initiative on CLL. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007;21:1-3.
35. Rosenquist R, Ghia P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Agathangelidis A, Baliakas P, Darzentas N, Giudicelli V, Lefranc MP, Langerak AW, Belessi C, Davi F, Stamatopoulos K. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations. *Leukemia* 2017;31:1477-1481.
36. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910-1916.

37. Malcikova J, Tausch E, Rossi D, Sutton LA, Soussi T, Zenz T, Kater AP, Niemann CU, Gonzalez D, Davi F, Gonzalez Diaz M, Moreno C, Gaidano G, Stamatopoulos K, Rosenquist R, Stilgenbauer S, Ghia P, Pospisilova S; European Research Initiative on Chronic Lymphocytic Leukemia (ERIC) — TP53 network. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia-update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia* 2018;32:1070-1080.
38. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* 2017;7:e577.
39. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IBO, Berti E, Bhagat G, Borges AM, Boyer D, Calaminici M, Chadburn A, Chan JKC, Cheuk W, Chng WJ, Choi JK, Chuang SS, Coupland SE, Czader M, Dave SS, de Jong D, Du MQ, Elenitoba-Johnson KS, Ferry J, Geyer J, Gratzinger D, Guitart J, Gujral S, Harris M, Harrison CJ, Hartmann S, Hochhaus A, Jansen PM, Karube K, Kempf W, Khoury J, Kimura H, Klapper W, Kovach AE, Kumar S, Lazar AJ, Lazzi S, Leoncini L, Leung N, Leventaki V, Li XQ, Lim MS, Liu WP, Louissaint A Jr, Marcogliese A, Medeiros LJ, Michal M, Miranda RN, Mitteldorf C, Montes-Moreno S, Morice W, Nardi V, Naresch KN, Natkunam Y, Ng SB, Oschlies I, Ott G, Parrens M, Pulitzer M, Rajkumar SV, Rawstron AC, Rech K, Rosenwald A, Said J, Sarkozy C, Sayed S, Saygin C, Schuh A, Sewell W, Siebert R, Sohani AR, Tooze R, Traverse-Glehen A, Vega F, Vergier B, Wechalekar AD, Wood B, Xerri L, Xiao W. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022;36:1720-1748.
40. Lejman M, Chałupnik A, Chilimoniuk Z, Dobosz M. Genetic Biomarkers and Their Clinical Implications in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *Int J Mol Sci* 2022;23:2755.
41. Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 2012;122:3407-3415.
42. Bardelli V, Arniani S, Pierini V, Di Giacomo D, Pierini T, Gorello P, Mecucci C, La Starza R. T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Biomarkers and Their Clinical Usefulness. *Genes (Basel)* 2021;12:1118.
43. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* 2022;97:1086-1107.
44. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, Richardson P, Caltagirone S, Lahuerta JJ, Facon T, Brinchen S, Gay F, Attal M, Passera R, Spencer A, Offidani M, Kumar S, Musto P, Lonial S, Petrucci MT, Orlowski RZ, Zamagni E, Morgan G, Dimopoulos MA, Durie BG, Anderson KC, Sonneveld P, San Miguel J, Cavo M, Rajkumar SV, Moreau P. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* 2015;33:2863-2869.
45. Cardona-Benavides IJ, de Ramón C, Gutiérrez NC. Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma: Prognostic and Therapeutic Implications. *Cells* 2021;10:336.
46. Kishimoto RK, de Freitas SL, Ratis CA, Borri D, Sitnik R, Velloso ED. Validation of interphase fluorescence in situ hybridization (iFISH) for multiple myeloma using CD138 positive cells. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2016;38:113-120.

HEMATOLOJİK
MALİGNİTELERDE GENETİK
ALGORİTMA KILAVUZU

IX.
BÖLÜM

HEMATOLOJİK MALİGNİTELERDE YENİ NESİL DİZİ ANALİZLERİNİN KULLANIMI

Yazarlar:
Sinem Kocagil
Ezgi Susam



9. HEMATOLOJİK MALİGNİTELERDE YENİ NESİL DİZİ ANALİZLERİNİN KULLANIMI

Yeni nesil dizi (NGS) veya ikinci nesil dizi analizleri, birinci nesil dizi analizlerine alternatif olarak ortaya çıkmış yöntemlerdir. Bu yöntem ile hızlı ve efektif bir şekilde yüksek hacimli veri analizinin yapılması sağlanmaktadır. Bu yöntem temel prensip olarak dört basamaktan oluşmaktadır. Kütüphane hazırlığı olarak adlandırılan ilk kısım, DNA'nın rastgele fragmanlara ayrılarak incelenmek istenen bölgenin işaretleyiciler/barkodlar yardımıyla tespit edilmesidir. İkinci kısım incelenecek fragmanların amplifikasyonu ve eş zamanlı olarak dizilenmesi işlemidir. Üçüncü kısım ise dizileme sonrası ham verinin oluşturulması, bunu takiben çeşitli biyoinformatik algoritmalar aracılığı ile referans dizi üzerine hastaya ait dizinin haritalanması ve hastaya ait varyantların referans genomla kıyasla tespit edilip belirlenmesidir. Dördüncü ve son basamakta ise veri analizi yer almaktadır. Veri analizi için saptanan varyantların mutlaka tıbbi genetik uzmanları, biyolog, moleküler biyolog, biyoinformatik uzmanları gibi ilgili alandaki uzmanlar tarafından değerlendirilmesi ve klinik öneminin yorumlanması/raporlanması gerekmektedir (1).

NGS, 2000'li yılların başından itibaren öncelikli olarak germline varyantların tanısında olmak üzere rutinde kullanılmış ve halen kullanılmaktadır. Hematolojik malignitelerde de sıklıkla hastalık ilişkili prognostik, terapötik ve tanısal belirteç olarak kullanılan tek nükleotid değişimleri, in/del varyantlar, füzyon genler ve kopya sayısı değişimlerini saptamak için NGS analizlerine başvurulmaktadır. Somatik ve germline varyantların analizlerinde farklı biyoinformatik algoritmalarının kullanılması ve her basamakta kalite skorlarının değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Analiz sonucunda yorumlanmak üzere tespit edilen varyantların okuma derinliği, ampikonların okuma yönü ve genotip kalitesi dikkat edilmesi gereken durumlardır (2). Tümör dokusunun heterojenitesi ve klonalite ihtimali göz önünde bulundurulduğunda NGS'de tüm somatik varyantlar için artmış okuma derinliğine (>1000x) ulaşılmış olması oldukça önemlidir. Variant allele frequency (VAF) saptanan varyanta ait okuma derinliğinin ilgili noktanın toplam okuma derinliğine oranı olup bu değer germline varyantlar için genellikle diploid genomun zigosite (heterozigot - %50, homozigot - %100) göstergesidir; ancak somatik analizlerde tümör heterojenitesine bağlı olarak değişkenlik gösterebileceği akılda tutulmalıdır. Çalışmalar sonucunda VAF değeri %40-60 arasında saptanan varyantların, konstitüsyonel bir değişim olması ihtimali nedeniyle germline varyantın tespit edilebilmesi için farklı dokulardan çalışılacak ek genetik tetkiklerle doğrulama yapılması önerilmektedir (3).

NGS sayesinde tek bir gen, hastalık özelinde oluşturulmuş paneller aracılığıyla eş zamanlı olarak çok sayıda gen, tüm ekzom veya tüm genom gibi incelemeler yapmak mümkündür. NGS hematolojik malignite hastalarında, sıklıkla hastalık özelinde oluşturulmuş çok sayıda genin yer aldığı paneller aracılığı ile uygulanmaktadır. Somatik varyantların değerlendirilmesi için rutinde sıkça kullanılan quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qPCR), Sanger dizi analizi gibi yöntemler ile NGS'nin karşılaştırılması Tablo 9.1'de yer verilmiştir (4).

Somatik varyantlar için hastalarda saptanan varyantlar hastanın klinik bulguları ve histopatolojik tanısı dahilinde yorumlanmalı, güncel varyant klasifikasyon önerilerinden faydalanılmalıdır (Tablo 9.2). American College of Medical Genetics, American Society of Clinical Oncology, College of American Pathologists'in ortak konsensüsü olarak 2017 yılında yayınlanan "Kanserde Sekans Varyantlarının

Tablo 9.1. Sanger sekans, qPCR ve NGS kullanım alanları, avantajları ve dezavantajları

Metot	Avantajları	Dezavantajları	Uygulama alanı
qPCR	- Basit iş akışı ve yöntem - Uygun fiyat/performans	- Gen, belli bir gen bölgesine veya füzyonlara spesifik - İncelenmek istenen nokta mutasyonu, gen füzyonu vb. dışında keşif gücü yok	Özgün bir gen veya gen bölgesine spesifik
Sanger	- Basit iş akışı ve yöntem - Uygun fiyat/performans	Gen, belli bir gen bölgesine spesifik	Özgün bir gen veya gen bölgesine spesifik
NGS	- Yüksek sensivite - Keşif, yeni varyant saptama gücü var - Düşük DNA konsantrasyonlarıyla yüksek hacimli veri - Varyant çözünürlüğü yüksek	- Yüksek hacimli verinin işlenmesi için biyoinformatik ihtiyacı - Varyantların klasifikasyonu ve yorumlanması - Sarf malzemesi fiyatları yüksek olması nedeni ile az örnek sayıları için fiyat performans uygunluğu düşük - Raporlanma süresi uzun	Hedeflenmiş çok sayıda gen eş zamanlı olarak incelenebilir
qPCR: Quantitative polymerase chain reaction, NGS: Yeni nesil dizi			

Tablo 9.2. Kanserde sekans varyantlarının yorumlanması ve raporlanması

Tier I: Yüksek klinik önemi olan varyantlar <i>Terapötik, prognostik ve tanısal belirteçler</i>	Tier II: Potansiyel klinik öneme sahip varyantlar <i>Terapötik, prognostik ve tanısal belirteçler</i>	Tier III: Klinik önemi bilinmeyen varyantlar	Tier IV: Benign ve olası benign varyantlar
Düzye A: FDA tarafından onaylanmış ve profesyonel kılavuzlara girmiş tedaviler	Düzye C: FFPE tarafından farklı tümör tiplerinde kullanımı onaylanmış tedaviler veya araştırma amaçlı yapılan tedavi çalışmaları Çok sayıda küçük ölçekli çalışma sonucunda oluşan çeşitli konsensüsler doğrultusunda	Genel popülasyonda/ spesifik bir alt gruba ait popülasyon veritabanında, pan-kanser veya tümör spesifik varyant veritabanlarında yer almayan varyantlar Yayımlanmış ikna edici kanıt içeriği olmayan	Genel popülasyonda/ spesifik bir alt gruba ait popülasyon veritabanında (1000 genome, GnomAD vb.) saptanan varyantlar Kanserle ilişkilendirilmiş yayınlanmış kanıt bulunmayan varyantlar
Düzye B: Geniş ölçekli çalışmalarda ve alanında uzmanlar tarafından oluşturulmuş konsensüslerde yer alan tedaviler	Düzye D: Preklinik çalışmalar ve ortak bir konsensüs olmadan birkaç olgu sunumu yer alan		

Yorumlanması ve Raporlanması” somatik varyantların raporlanmasında en sık başvuru kılavuzdur. Bu kılavuzun önerileriyle saptanan somatik varyantların kanıt düzeyleri (Düzye A, B, C, D) doğrultusunda, dört kategori (Tier I, II, III, IV) altında incelenmesi önerilmiştir. AMP/ACMG kanserde sekans varyantları raporlanma kriterlerine Tablo 9.2’de yer verilmiştir.

Tier I olarak adlandırılan ilk kategori yüksek klinik önemi olan terapötik, prognostik ve tanısal belirteçlerin dahil olduğu Düzye A ve B kanıtlarını karşılayan varyantları içermektedir. Tier II olarak adlandırılan potansiyel klinik öneme sahip

varyantlar ise Düzey C ve B kanıtlarını karşılayan varyantları içermektedir. Tier III varyantlar, klinik önemi bilinmeyen varyantlar olarak sınıflandırılmaktadır. Tier IV varyantlar ise benign ve olası benign varyantlar olup genel popülasyon veritabanlarında yer alan ve kanserle ilişkilendirilmiş yayınlanmış kanıt bulunmayan varyantlardır (3,5).

Saptanan somatik varyantların yorumlanması ve klasifikasyonu için çeşitli veritabanlarında yararlanılmaktadır. Bu veritabanları ve detayları ile ilgili bilgiler Tablo 9.3'te özetlenmiştir.

Tier I ve II varyantlar, klinik önemi bilinen değişimler olması nedeniyle raporlarda mutlaka yer verilmesi gereken değişimlerdir. Tier III değişimlerin klinik önemi bilinmeyen değişimler olduğu belirtilerek rapora ilave edilmesi, Tier IV değişimlerin ise germline olduğundan şüpheleniliyorsa (VAF $\geq$ %50) konfirmasyon testlerinin yapılması sonrası ek bir başlık altında raporlanması gerekmektedir. Raporlama sürecinde dikkat edilmesi önerilen noktalar arasında, incelenen dokudaki tümör

Tablo 9.3. Somatik sekans varyantlarının analizinde kullanılan güncel veritabanları

Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC)

<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

My Cancer Genome

<https://www.mycancergenome.org/>

Personalized cancer therapy, MD Anderson Cancer Center

<https://pct.mdanderson.org>

cBioPortal, Memorial Sloan Kettering Cancer Center

<http://www.cbioportal.org>

International Cancer Genome Consortium

<https://dcc.icgc.org>

Pediatric Cancer Genome Project (St. Jude Children's Research Hospital-Washington University)

<https://permalinks.stjude.cloud/permalinks/pcgp>

OnkoKB™ MSK's Precision Oncology Knowledge Base

<https://www.oncokb.org/>

Varsome The Human Genomics Community

<https://varsome.com/>

Franklin by Genoox

<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>

dokusunun yüzdesinin ve histopatolojik tanının bilinmesi gerekliliğidir. Saptanmış olan varyantların COSMIC veritabanı gibi veritabanlarında daha önce bildirilip bildirilmediği, saptanan VAF ve saptanan varyantın tanı özelinde güncel kılavuzlarca varyant klasifikasyonuna (Tier I, II, III) raporda yer verilmelidir. Kanıt düzeyleri doğrultusunda mevcut olan terapötik hedefler, prognostik veya tanısallı belirteçler de hasta/hastalık özelinde belirtilmelidir.

Minimal Rezidüel Hastalık Takibi ve NGS

Minimal rezidüel hastalık (MRD) takibinin NGS analizi ile yapılması son yıllarda geniş hasta kohortlarında gerçekleştirilmeye başlanmıştır. Eş zamanlı çok sayıda genin değerlendirilebilir olması, yeni varyantlara özgün primer hazırlığı gerektirmemesi ve küçük klonlarda yer alan düşük frekanslı (VAF $\geq 0,1$) somatik mutasyonları tespit edebilir olması nedeniyle NGS'ler MRD takibinde geliştirilebilir bir yöntem olarak qPCR ve MFC'ye alternatif olabileceği düşünülmektedir (6).

9.1. Akut Myeloid Lösemi

Akut myeloid lösemi (AML) tanılı hastalarda prognostik ve terapötik etki taşıyan mutasyonların tanımlanması ile birlikte, tüm AML olguları için moleküler profillemeye yapılması tanısallı analizlerin standart bir parçası haline gelmiştir. Tablo 9.4'te yer alan *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *NPM1* genlerindeki özgün mutasyonların 3-5 iş günü içerisinde sonuç verilecek şekilde tanı anında periferik kan/kemik iliği örneklerinde değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu genetik aberasyonların ilk basamak tedavi planlamasında önemli olmasından ve hastalığın hızlı aksiyon alınması gereken bir hastalık olmasından dolayı, tanı anında sıklıkla terapötik hedef olan genlerdeki varyantların değerlendirilmesi için hızlı ve basit teknikler olarak fragman analizi, qPCR vb. konvansiyonel yöntemlere başvurulmaktadır (7).

Dünya Sağlık Örgütü 2022 AML klasifikasyonunda prognostik ve tanısallı belirteçler olarak yer alan *CEPBA*, *DDX41*, *TP53*, *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*,

Tablo 9.4. Konvansiyonel yöntemler ile değerlendirilen genler ve saptanan varyantlar

Gen	Varyant
<i>FLT3</i>	ITD, TKD mutasyonları
<i>NPM1</i>	Ekzon 12 çerçeve kayması mutasyonlar
<i>IDH1</i>	Yanlış anlamlı: R132 kodon
<i>IDH2</i>	Yanlış anlamlı: R140, R172

STAG2, *U2AF1* ve/veya *ZRSR2* genlerinin mutasyonlarının ilk tedavi kür döngüsü sırasında sonuçlanacak şekilde değerlendirilmesi önerilmektedir. NGS panelleri ile yapılacak çalışmalarda bu süre zarfında raporlamanın yapılmasına dikkat edilmelidir (8). Bu genlere ilave olarak AML olgularında *NKRD26*, *BCORL1*, *BRAF*, *CBL*, *CSF3R*, *DNMT3A*, *ETV6*, *GATA2*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *NRAS*, *NF1*, *PHF6*, *PPM1D*, *PTPN11*, *RAD21*, *SETBP1*, *TET2*, *WT1* genlerinin dizilenmesi de önerilmektedir; ancak bu genlerin aksiyon alınabilir tedavi hedefleri olmaması, hastalığın ileriki takibi (MRD) açısından değerlendirilebilir olmasından dolayı ikinci basamakta planlama yapılabilmektedir. Bu hasta grubu için özellikle NGS çalışmaları için kısıtlılık olarak sayılabilecek durum, analizlerin standartizasyonunun sağlanması ve sonuçlanma (numune kabul-raporlama) sürelerinin hızlı olması gerekliliğidir (9,10).

9.2. Myelodisplastik Neoplaziler

Myelodisplastik neoplaziler, NGS'nin hastalığın tanısal amaçlı ve prognostik skorlama açısından rutin klinik uygulamalarında en sık başvuru alan myeloid neoplaziler arasında yer almaktadır. NCCN kılavuzlarında yer alan myelodisplastik sendromlarda rutinde incelenmesi önerilen ve klinik önemi olan somatik mutasyonların eşlik ettiği genler Tablo 9.5'te özetlenmiştir (11).

9.3. Myeloproliferatif Neoplaziler

KML hastalarında NGS, TKI direnci gelişen hastalarda düşük seviyeli *BCR-ABL1* kinaz domain mutasyonlarının saptanabilmesi, ilave olarak yeni tanı, akselere faz ve blastik faz hastalarında *ASXL1*, *RUNX1*, *IKZF1*, *TET1/2*, *IDH1/2*, *JAK2*, *DNMT3A/3B*, *EZH2*, *WT1*, *NPM1*, *NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *BCOR*, *CREBBP*, *TP53* genlerindeki mutasyonların değerlendirilebilmesi için kullanılmaktadır (12).

Philedelphia kromozomu negatif MPN'ler olarak adlandırılan polisitemia vera, primer myelofibroz ve esansiyel trombositemi, kronik nötrofilik lösemi, kronik eozinofilik lösemi, juvenil myelomonositik lösemi, MPN NOS (MPN başka şekilde tanımlanmayan) spesifik driver gen mutasyonlarına (*JAKV617F* mutasyonu, *CALR*, *MPL*, *JAK2* ekzon 12 mutasyonları) bağlı olarak klonal disregülasyonla karakterize hastalıklardır. Son yıllarda myeloproliferatif hastalık şüphesi olan olguların primer tanı sürecinde yukarıda bahsedilen driver gen mutasyonlarına konvansiyonel moleküler yöntemlere alternatif olarak NGS analizi yöntemleri aracılığı ile bakılması önerilmektedir. Kılavuzda ikinci bölümde detaylı olarak anlatıldığı üzere son yıllarda PMF hastalarında, *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2*, *U2AF1* (157. kodon), *RAS*, *IDH1/2*, *TP53*, *DNMT3A*, *CBL* genlerinin onkojenik mutasyonlarının moleküler risk skorlaması amacıyla tanı anında incelenmesi özellikle *JAK2*, *CALR*, *MPL* genlerinde

Tablo 9.5. Myelodisplastik neoplazilerde incelenmesi önerilen genler ve bu genlerde sık izlenen mutasyonlar

Gen	Sık izlenen değişimler	Mutasyon görülme sıklığı
<i>TET2</i>	Erken dur kodonu, çerçeve kayması ve kırılma bölgesi mutasyonları 1134-1444. veya 1842-1921. kodonlardaki yanlış anlamlı mutasyonlar	%20-25
<i>DNMT3A</i>	Erken dur kodonu, çerçeve kayması ve kırılma bölgesi mutasyonları S770, M880, R882, W893, P904, A910, G543, R635, A741, R736, H739 kodonlardaki yanlış anlamlı mutasyonlar	%12-18
<i>ASXL1</i>	Erken dur kodonu, çerçeve kayması	%15-25
<i>EZH2</i>	Erken dur kodonu, çerçeve kayması	%5-10
<i>SF3B1</i>	E622, Y623, R625, N626, H662, T663, K666, K700E, I704, G740, G742, D781 kodonlardaki yanlış anlamlı mutasyonlar	%20-30
<i>SRSF2</i>	Yanlış anlamlı mutasyonlar, P95 kodonunun çerçeve içi delesyonları	%10-15
<i>U2AF1</i>	S34 ve Q157'deki yanlış anlamlı mutasyonlar	%8-12
<i>ZRSR2</i>	Erken dur kodonu, çerçeve kayması mutasyonları	%5-10
<i>RUNX1</i>	Erken dur kodonu, çerçeve kayması mutasyonları	%10-15
<i>TP53</i>	Erken dur kodonu, çerçeve kayması ve kırılma bölgesi mutasyonları Yanlış anlamlı mutasyonlar: P47S ve P72R kodonlar	%8-12
<i>STAG2</i>	Erken dur kodonu, çerçeve kayması ve kırılma bölgesi mutasyonları	%5-10
<i>NRAS</i>	Yanlış anlamlı mutasyonlar: G12, G13, Q61 kodonu	%5-10
<i>CBL</i>	366-420. kodonlardan herhangi birindeki yanlış anlamlı mutasyonlar	<%5
<i>NF1</i>	Erken dur kodonu, çerçeve kayması ve kırılma bölgesi mutasyonları	<%5

klonal mutasyon saptanmayan olgularda tanı anında ilgili genlerin yer aldığı NGS panellerinin çalışması gerekmektedir. Polistemi vera hastalarında *ASXL1*, *SRSF2*, *IDH1/2*, *RUNX1*, *SRSF2* genlerinin, esansiyel trombositemi hastalarında ise *SH2B3*, *IDH2*, *U2AF1*, *SRSF2*, *SF3B1*, *EZH2*, *TP53*, *RUNX1* genlerinin dizi analizi ile değerlendirilmesi NCCN kılavuzlarında önerilmektedir (13).

9.4. Multipl Myeloma

MM tanılı olgularda, *TP53* geni başta olmak üzere, *ATR*, *ATM*, *ZFHX4*, *BRAF*, *EGR1*, *IRF4* ve *TRAF3* genlerinde saptanan mutasyonların prognostik değeri olduğu ve bu genlerin yer aldığı panellerin NGS ile risk klasifikasyonu açısından incelenmesi önerilmektedir (14).

MM'de NGS'nin kullanım alanları arasında MRD takibi ön plana çıkmaktadır. NCCN kılavuzunda yeni tanı hastalarda, özellikle CD138+ plazma hücrelerinin seleksiyonu sonrası, gelecekte MRD takibi yapılabilmesi için klonalite tayininde NGS analizleri önerilmektedir (15). IMWG yakın zamanda, başta sıklıkla kullanılan valide edilmiş bir platform olması nedeniyle *LymphoSIGHT* platformu (*Sequentia/Adaptive*) olmak üzere, benzer ticari seçenekler de dahil olacak şekilde, minimum duyarlılığı $<10^{-5}$ olan NGS temelli platformlarında *IGH-VDJH*, *IGH-DJH* ve *IGK* bölgelerinin sekanslanması ve *IGH* rearanjmanlarının tespit edilerek MRD takibinde kullanılmasını önermiş, özgün klonal değişimlerin saptanmadığı durumlar için NGS-MRD negatifliği teriminin kullanılmasını öne sürmüşlerdir (16,17).

9.5. Kronik Lenfositik Lösemi

KLL tanılı olgularda NGS, *TP53* geni başta olmak üzere *NOTCH1*, *SF3B1* ve *BIRC3* genlerinin dahil olduğu panel çalışmaları risk sınıflandırılması için kullanılabilmektedir. ERIC önerileri doğrultusunda MRD takibinin en az 1×10^{-4} duyarlılığa sahip yöntemlerle değerlendirilmesi önerilmektedir (18,19). NCCN'de, KLL'de MRD takibi için allel-spesifik oligonükleotid polimeraz zincir reaksiyonu (ASO-PCR) ve MRD Flow gibi valide yöntemlere ilave olarak, tedavi öncesi dominant *IGH* klonalitesinin tayin edilmesi sonrası standardize edilmiş ve diğer yöntemlere göre artmış bir duyarlılığa (1×10^{-6}) sahip NGS analizlerinin de kullanılabileceği bildirilmiştir (20,21).

9.6. Akut Lenfoblastik Lösemi

ALL tanılı olgularda NGS, moleküler karakterizasyon ve risk sınıflandırılması açısından *IL7R*, *SH2B3*, *JAK1*, *JAK3*, *JAK2* genlerinin nokta mutasyonları ve *ABL1*, *ABL2*, *CRLF2*, *CSF1R*, *EPOR*, *JAK2* ve *PDGFRB* genlerinin dahil olduğu nadir RNA füzyon

transkriptlerinin değerlendirilmesi için kullanılmaktadır. Hipodiploid ALL olgularının germline *TP53* patojenik mutasyonlara bağlı ortaya çıkma olasılığının olduğu unutulmamalıdır. Bu hasta grubunda aile öyküsü değerlendirilmesi sonucunda genetik danışmanlık eşliğinde *TP53* geni dizi analizleri önerilmelidir.

ALL'de de artmış bir duyarlılığa (1×10^{-6}) sahip olması nedeniyle de NGS kullanımı MRD takibinde son yıllarda ön plana çıkmıştır. Özellikle klonal *IGH* ve *T-cell receptor* rearranjanlarının ve yukarıda bahsedilen diğer füzyon transkriptlerinin MRD takibinde ALL olgularında değerlendirilmesini öneren çalışmalar mevcuttur (22,23).

Kaynaklar

1. Kanzi AM, San JE, Chimukangara B, Wilkinson E, Fish M, Ramsuran V, de Oliveira T. Next Generation Sequencing and Bioinformatics Analysis of Family Genetic Inheritance. *Front Genet* 2020;11:544162.
2. Merker JD, Valouev A, Gotlib J. Next-generation sequencing in hematologic malignancies: what will be the dividends? *Ther Adv Hematol* 2012;3:333-339.
3. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, Tsimberidou AM, Vnencak-Jones CL, Wolff DJ, Younes A, Nikiforova MN. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017;19:4-23.
4. Bacher U, Shumilov E, Flach J, Porret N, Joncourt R, Wiedemann G, Fiedler M, Novak U, Amstutz U, Pabst T. Challenges in the introduction of next-generation sequencing (NGS) for diagnostics of myeloid malignancies into clinical routine use. *Blood Cancer J* 2018;8:113.
5. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Reh H; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405-424.
6. Levine RL, Valk PJM. Next-generation sequencing in the diagnosis and minimal residual disease assessment of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2019;104:868-871.
7. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, Wang SA, Bagg A, Barbui T, Branford S, Bueso-Ramos CE, Cortes JE, Dal Cin P, DiNardo CD, Dombret H, Duncavage EJ, Ebert BL, Estey EH, Faccetti F, Foucar K, Gangat N, Gianelli U, Godley LA, Gökbuegüt N, Gotlib J, Hellström-Lindberg E, Hobbs GS, Hoffman R, Jabbour EJ, Kiladjan JJ, Larson RA, Le Beau MM, Loh ML, Löwenberg B, Macintyre E, Malcovati L, Mullighan CG, Niemeyer C, Odenike OM, Ogawa S, Orfao A, Papaemmanuil E, Passamonti F, Porkka K, Pui CH, Radich JP, Reiter A, Rozman M, Rudelius M, Savona MR, Schiffer CA, Schmitt-Graeff A, Shimamura A, Sierra J, Stock WA, Stone RM, Tallman MS, Thiele J, Tien HF, Tzankov A, Vannucchi AM, Vyas P, Wei AH, Weinberg OK, Wierzbowska A, Cazzola M, Döhner H, Tefferi A. International Consensus Classification of Myeloid

Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* 2022;140:1200-1228.

8. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Godley LA, Hasserjian RP, Larson RA, Levine RL, Miyazaki Y, Niederwieser D, Ossenkoppele G, Röllig C, Sierra J, Stein EM, Tallman MS, Tien HF, Wang J, Wierzbowska A, Löwenberg B. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* 2022;140:1345-1377.
9. Fuchs O, Kostecka A, Provaznikova D, Krasna B, Brezinova J, Filukova J, Kotlin R, Kouba M, Kobylka P, Neuwirtova R, Jonasova A, Caniga M, Schwarz J, Markova J, Maaloufova J, Sponerova D, Novakova L, Cermak J. Nature of frequent deletions in CEBPA. *Blood Cells Mol Dis* 2009;43:260-263.
10. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Acute Myeloid Leukemia, version 4, 2023.
11. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Myelodysplastic syndromes, version 1, 2023.
12. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Chronic Myeloid Leukemia, version 1, 2024.
13. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Myeloproliferative Neoplasms, version 3, 2022.
14. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Multiple Myeloma, version 3, 2023.
15. Dimopoulos MA, Moreau P, Terpos E, Mateos MV, Zweegman S, Cook G, Delforge M, Hájek R, Schjesvold F, Cavo M, Goldschmidt H, Facon T, Einsele H, Boccadoro M, San-Miguel J, Sonneveld P, Mey U; EHA Guidelines Committee. Electronic address: guidelines@ehaweb.org; ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol* 2021;32:309-322.
16. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, Munshi N, Lonial S, Bladé J, Mateos MV, Dimopoulos M, Kastritis E, Boccadoro M, Orłowski R, Goldschmidt H, Spencer A, Hou J, Chng WJ, Usmani SZ, Zamagni E, Shimizu K, Jagannath S, Johnsen HE, Terpos E, Reiman A, Kyle RA, Sonneveld P, Richardson PG, McCarthy P, Ludwig H, Chen W, Cavo M, Harousseau JL, Lentzsch S, Hillengass J, Palumbo A, Orfao A, Rajkumar SV, Miguel JS, Avet-Loiseau H. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016;17:e328-e346.
17. Bolli N, Genuardi E, Ziccheddu B, Martello M, Oliva S, Terragna C. Next-Generation Sequencing for Clinical Management of Multiple Myeloma: Ready for Prime Time? *Front Oncol* 2020;10:189.
18. Agathangelidis A, Chatzidimitriou A, Chatzikonstantinou T, Tresoldi C, Davis Z, Giudicelli V, Kossida S, Belessi C, Rosenquist R, Ghia P, Langerak AW, Davi F, Stamatopoulos K; ERIC, the European Research Initiative on CLL. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: the 2022 update of the recommendations by ERIC, the European Research Initiative on CLL. *Leukemia* 2022;36:1961-1968.

19. Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, Villamor N, Letestu R, Nomdedeu J, Palacio C, Stehlikova O, Kreuzer KA, Liptrot S, O'Brien D, de Tute RM, Marinov I, Hauwel M, Spacek M, Dobber J, Kater AP, Gambell P, Soosapilla A, Lozanski G, Brachtl G, Lin K, Boysen J, Hanson C, Jorgensen JL, Stetler-Stevenson M, Yuan C, Broome HE, Rassenti L, Craig F, Delgado J, Moreno C, Bosch F, Egle A, Doubek M, Pospisilova S, Mulligan S, Westerman D, Sanders CM, Emerson R, Robins HS, Kirsch I, Shanafelt T, Pettitt A, Kipps TJ, Wierda WG, Cymbalista F, Hallek M, Hillmen P, Montserrat E, Ghia P. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. *Leukemia* 2016;30:929-936.
20. Thompson PA, Srivastava J, Peterson C, Strati P, Jorgensen JL, Hether T, Keating MJ, O'Brien SM, Ferrajoli A, Burger JA, Estrov Z, Jain N, Wierda WG. Minimal residual disease undetectable by next-generation sequencing predicts improved outcome in CLL after chemoimmunotherapy. *Blood* 2019;134:1951-1959.
21. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma, version 3, 2022.
22. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, Harvey RC, Yang YL, Pei D, McCastlain K, Ding L, Lu C, Song G, Ma J, Becksfort J, Rusch M, Chen SC, Easton J, Cheng J, Boggs K, Santiago-Morales N, Iacobucci I, Fulton RS, Wen J, Valentine M, Cheng C, Paugh SW, Devidas M, Chen IM, Reshmi S, Smith A, Hedlund E, Gupta P, Nagahawatte P, Wu G, Chen X, Yergeau D, Vadodaria B, Mulder H, Winick NJ, Larsen EC, Carroll WL, Heerema NA, Carroll AJ, Grayson G, Tasian SK, Moore AS, Keller F, Frei-Jones M, Whitlock JA, Raetz EA, White DL, Hughes TP, Guidry Auvil JM, Smith MA, Marcucci G, Bloomfield CD, Mrózek K, Kohlschmidt J, Stock W, Kornblau SM, Konopleva M, Paietta E, Pui CH, Jeha S, Relling MV, Evans WE, Gerhard DS, Gastier-Foster JM, Mardis E, Wilson RK, Loh ML, Downing JR, Hunger SP, Willman CL, Zhang J, Mullighan CG. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2014;371:1005-1015.
23. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Acute Lymphoblastic Leukemia, version 2, 2023.

NOTLAR

Handwriting practice lines consisting of 24 horizontal dotted lines.

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

